AGRONOMIA LUSITANA

VOL. 19 — N.º 2

1957

ESTAÇÃO AGRONÓMICA NACIONAL

SACAVÉM

PORTUGAL

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL

-7 FEB 1958

CHROMOSOME STUDIES IN *CITRUS*. I

BY

ARUN KUMAR SHARMA

AND

ARYA KUMAR BAL

(Cytogenetics Laboratory, Botany Department, Calcutta University)

INTRODUCTION

VAST amount of works have been carried out in India on the cytogenetics of plants of economic importance. Considerable data have accumulated on the characteristics of the chromosomes of crop plants including those yielding edible fruits. Not only the chromosome studies, but also breeding work have been performed, which have helped considerably in tracing the geneology of species.

The genus *Citrus* is represented in India by a number of species which are specially cultivated for economic purposes. Innumerable cultivars have been raised by horticulturists, following propagation through cuttings. The importance of Oranges as edible fruits and that of other *Citrus* yielding Lemon juice or Lemon oil needs no introduction. Cultivation of plants through seeds in *Citrus* is much less practised than through vegetative means. Not only a large number of species of this genus is found to occur in India, but their distribution also has been found to be widespread. They occur both in the temperate and the tropical regions.

It is indeed remarkable that in the different species of *Citrus* so far studied, uniformity in the chromosome number has always been noticed. Inspite of the different species being grown under different ecological conditions, this uniformity in the chromosome number remains unhampered. Recently, however, in Japan, the occurrence of natural tetraploids of *Citrus Junos, C. Unshiu, C. Natsudaidai, C. Aurantium* (FURUSATO, 1952) has been reported. The cytology of the innumerable *Citrus* species and cultivars growing in India is not at all systematically worked out, although reports of chromosome numbers are available of some of them.

In view of the economic importance of the species belonging

to this genus, the scanty literature on their cytology as well as ample scope of their improvement through cytological means, the present investigation on the cytogenetics of different species of this genus have been undertaken. The present report is a part of the scheme of work on this genus and deals with the chromosome studies of ten different taxa of *Citrus*.

MATERIALS AND METHODS

Materials for the present investigation were furnished by plants raised from cuttings obtained from the Imperial Nursery, Calcutta. The following are the names of plants investigated:

1. *Citrus acida aurantifolia* Pers. cv. "China"
2. *Citrus acida aurantifolia* Pers. cv. "Columbia"
3. *Citrus acida aurantifolia* Pers. cv. "Gora"
4. *Citrus decumana* Murr. cv. "Chinese"
5. *Citrus decumana* Murr. cv. "Monster Kalsia"
6. *Citrus decumana* Murr. cv. "Red fleshed"
7. *Citrus decumana* Murr. cv. "White fleshed"
8. *Citrus Limetta* Risso cv. "Elachi"
9. *Citrus Limetta* Risso cv. "Sarbati"
10. *Citrus microcarpa* Bunge

All the plants are cultivated for their edible fruits except *Citrus microcarpa* Bunge which is an ornamental plant grown in the gardens.

Root-tips were collected from plants grown in pots, and were studied following different techniques, which are as follows:

1) *Temporary preparations* — For temporary preparations Aceto-orcein squashes were made after pre-treatment in different chemicals such as Coumarin (Sharma & Bal, 1953), Aesculin (Sharma & Sarkar, 1955) and Para-dichlorobenzene (Sharma & Mookerjea, 1955).

2) *Permanent preparations* — For permanent preparation the following fixatives were used:

a) Chromic: Formalin — 1 % Chromic acid: 10 % Formalin (1:1, 1:2, 1:3).
b) Platinic: Formalin — 1 % Platinic chloride: 10 % Formalin (1:1, 1:2, 1:3).

Materials were then embedded in paraffin and sections of 14 μ thickness were cut.

Newton's crystal violet technique was employed in staining with the following modifications:

a) Over-night bleaching in 95 % Alcohol and Hydrogen peroxide (10 volumes) 1 : 1, in case of Platinic chloride fixed materials.

b) Pre-mordanting in 1 % Chromic Acid for 24 hours in case of materials fixed in 1 : 2, 1 : 3 Chromic : Formalin or Platinic : Formalin.

Temporary preparation yielded better results in some of the plants than permanent ones. *Citrus acida aurantifolia* cv. "Columbia", *Citrus decumana* cv. "Monster Kalsia" and *Citrus microcarpa* produced well displayed plates in temporary mounts after pre-treatment in Aesculin for ½ hour in case of the former two and para-dichlorobenzene for 2 ½ hours in the latter.

Other plants gave satisfactory results only in permanent mounts. In general Chromic : Formalin 1 : 1, 1 : 2 and Platinic : Formalin 1 : 1, 1 : 2 were found to be the most suitable ones for different species and cultivars, which are as follows:

Citrus acida aurantifolia Pers. cv. "China"	Chromic : Formalin 1 : 2
C. decumana Murr. cv. "Red fleshed"	—do—
C. decumana Murr. cv. "White fleshed"	—do—
C. Limetta Risso cv. "Sarbati"	—do—
C. acida aurantifolia Pers. cv. "Gora"	Platinic : Formalin 1 : 2
C. decumana Murr. cv. "Chinese"	—do—
C. Limetta Risso cv. "Elachi"	Chromic : Formalin 1 : 1

Figures were drawn at a table magnification of × 3600 and × 3000 using Leitz compensating eye-piece × 20 in case of permanent preparations and × 12.5 for temporary mounts and a 1.3 apo-chromatic objective with an aplanatic condenser of 1.4 N. A.

OBSERVATION

Our observation includes study of the chromosome complement in ten different cultivars of different species of *Citrus*. It has been found that the sizes of the chromosomes are very short, varying from 3.5 μ - 1 μ in size. Size difference is marked amongst

the chromosomes and accordingly they form a graded series of long, medium sized and short chromosomes. The normal chromosome number has been found to be $2n = 18$ except in one, *C. decumana* "Monster Kalsia", where the normal number of chromosomes is $2n = 21$. In addition to these, variation from the normal number, unequal separation, and even somatic reduction have also been found to be characteristics in some of the cultivars. The long type of chromosomes generally possess the secondary constrictions, the number being in most of the cases six, but ranging from eight to four in different plants.

Observation in details on different cultivars are given below separately.

1. *Citrus acida aurantifolia* Pers. cv. "China"

The normal chromosome number of the species was found to be $2n = 18$ (Fig. 1). Size difference is marked and the chromosomes are divisible under the following groups on the basis of it:

1) Three pairs of long chromosomes (3.2 μ).
2) Three pairs of medium sized chromosomes (1.8 μ).
3) Three pairs of short chromosomes (1.2 μ-1 μ).

Six of them are seen to bear satellites or secondary constrictions.

Detailed study of the chromosome morphology as made from a number of plates marks out the following types (Fig. 2).

Type A — Two pairs of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one in the median and the other in the subterminal positions (3.2 μ).

Type B — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one in the submedian position and the other in a nearly subterminal position at the distal end of the longer arm (3.2 μ).

Type G — Three pairs of medium sized chromosomes having submedian primary constrictions (1.8 μ).

Type I — One pair of short chromosomes, each having a nearly subterminal primary constriction (1.2 μ).

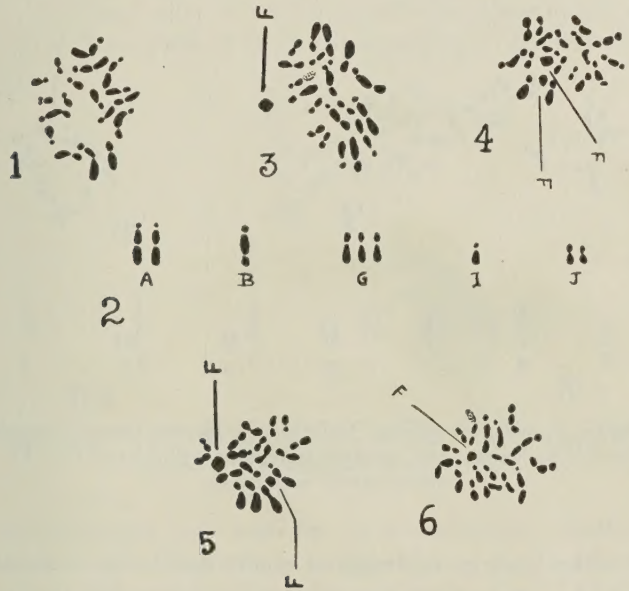
Type J — Two pairs of short chromosomes having median to nearly submedian primary constrictions (1 μ).

Apart from this normal number, somatic nuclei with varying numbers have also been observed e. g., 19 + 1 F, 18 + 2F, 17 + 2F,

17 + 1 F (Figs. 3, 4, 5, 6). Fuzzy appearance of the distal end of one of the chromosomes in Figs. 3 & 6 is not worthy.

2. *Citrus acida aurantifolia* Pers. cv. "Columbia"

The number 2n = 19 was found to be occurring in a high frequency in different nuclei of the root-tip. (Fig. 7). As such



Figs. 1-6 — *Citrus acida aurantifolia* cv. "China" — Normal somatic metaphase (2n = 18), idiogram and variation metaphase with 19 + 1 F, 18 + 2F, 17 + 2F and 17 + 1F chromosomes respectively.

chromosome studies have been made from plates with chromosome numbers 2n = 19.

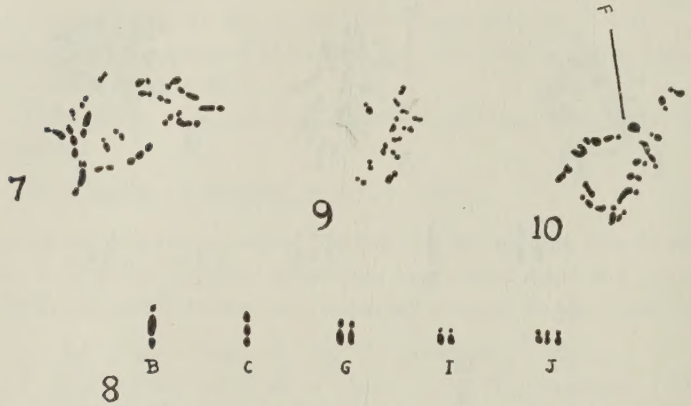
The chromosomes vary in size and on its basis the chromosomes are divisible under the following groups:

1) Two pairs of long chromosomes (3.5 μ-3 μ).
2) Two pairs of medium sized chromosomes (2.2 μ).
3) Five pairs of short chromosomes (1.5 μ-1 μ).
(One of the pair is in triplicate)

Four chromosomes are seen to bear satellites or secondary constrictions.

Detailed study of the chromosome morphology, as made from a number of plates, marks out the following types (fig. 8):

Type B — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one submedian in position



Figs. 7-10 — *C. acida aurantifolia* "Columbia" — Normal somatic metaphase (2n = 19), idiogram and variation metaphase with 13 and 15 + 1F chromosomes respectively

and the other nearly subterminal at the distal end of the longer arm (3.5 μ).

Type C — One pair of long chromosomes, each having two constrictions primary and secondary, one nearly submedian in position and the other nearly submedian on the longer arm, the length of the chromosome arm between the two being much shorter than in B (3 μ).

Type G — Two pairs of medium sized chromosomes with submedian primary constrictions (2.2 μ).

Type I — Two pairs of short chromosomes, each having a nearly subterminal primary constriction (1.5 μ to 1.2 μ).

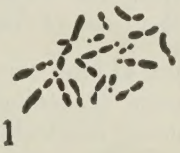
Type J — Seven short chromosomes having median to nearly submedian primary constrictions (1 μ).

Apart from the number 2n = 19, variation was observed in different nuclei e. g. 2n = 13 and 15 + 1F (figs. 9 and 10).

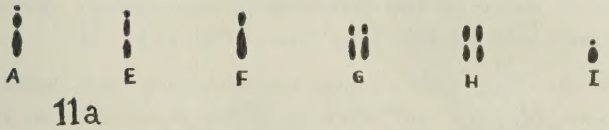
3. *Citrus acida aurantifolia* Pers. cv. "Gora"

The normal number of the species was found to be 2n = 18 (Fig. 11). Size difference is present and the chromosomes are divisible under the following groups on its basis:

1) Three pairs of long chromosomes (3 μ).
2) Four pairs of medium-sized chromosomes (2 μ).
3) Two pairs of short chromosomes (1.5 μ - 1.2 μ).



11



11a

Figs. 11-11a — *C. acida aurantifolia* — Normal somatic metaphase (2n = 18) and idiogram respectively.

Four chromosomes are seen to bear secondary constrictions. Detailed study of chromosomes morphology as made from metaphase plates distinguishes the following types (Fig. 11a):

Type A — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one in the median the other in the subterminal position (3 μ).

Type E — One pair of long chromosomes, each having two constrictions primary and secondary, one in the nearly median and the other in the submedian position at the other end of the longer arm (3 μ).

Type F — One pair of long chromosomes each having a nearly submedian primary constriction (3 μ).

Type G — Two pairs of medium sized chromosomes each having a submedian primary constriction (2 μ).

Type H — Two pairs of medium sized chromosomes with median primary constrictions (2 μ).

Type I — One pair of short chromosomes each having a nearly subterminal primary constriction (1.5 μ).

Type J — One pair of short chromosomes each having a nearly median primary constriction (1.2 μ).

4. *Citrus decumana* MURR. cv. "Chinese"

The normal chromosome number of the species was found to be 2n = 18 (Fig. 12). Size difference is present, the chromosomes forming a graded series. The chromosomes are divisible into the following groups on the basis of their relative size:

1) Four pairs of long chromosomes (2.7 μ-2.2 μ).
2) Three pairs of medium sized chromosomes (1.8 μ).
3) Two pairs of short chromosomes (1.2 μ-1 μ).

Of them 8 chromosomes are seen to bear secondary constrictions.

Detailed study of the chromosome morphology divides the chromosomes into the following types (Fig. 13):

Type A — One pair of long chromosomes each having two constrictions, primary and secondary, one in the median and the other in the subterminal position (2.7 μ).

Type B — One pair of long chromosomes each having two constrictions, primary and secondary, one in the nearly submedian position and the other nearly subterminal at the distal end of the longer arm (2.5 μ).

Type C — One pair of long chromosomes each having two constrictions, primary and secondary, one in the nearly submedian position and the other located in the middle of the longer arm (2.5 μ).

Type D — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one in the submedian position and the other located in the middle of the longer arm. It differs from C, in having the gaps of one of the constrictions very much pronounced (2.2 μ).

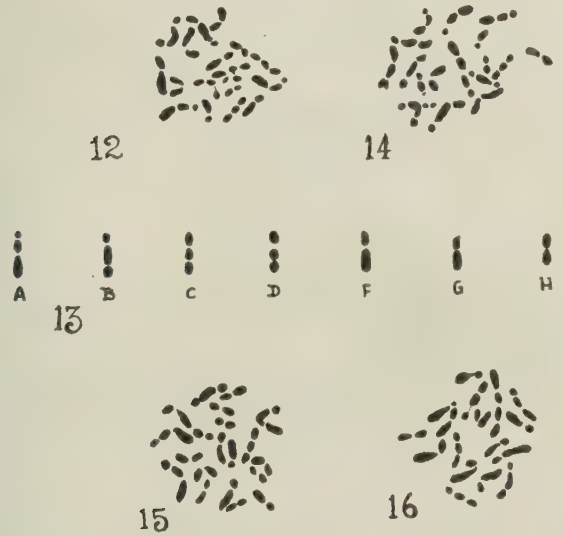
Type F — One pair of long chromosomes with submedian primary constrictions (2.2 μ).

Type G — One pair of medium-sized chromosomes with submedian primary constrictions (1.8 μ).

Type H — One pair of medium-sized chromosomes having median primary constrictions (1.8 μ).

Type J — Two pairs of short chromosomes with median to submedian primary constrictions (1.2 μ-1 μ).

Varying numbers in the roottip cells were observed. Different nuclei showed 2n = 19, 20 and also the normal number 18 with a different chromosome morphology (Fig. 14, 15, 16).



Figs. 12-16 — *C. decumana* cv. "Chinese" — Normal somatic metaphase (2n = 18), idiogram and variation metaphase with 19, 20 and 18 chromosomes respectively.

5. *Citrus decumana* Murr. cv. "Monster Kalsia"

The normal number of the species was found to be 2n = 21 in the roottip cells. Size difference is marked and the chromosomes are divisible under the following groups on its basis (Fig. 17):

1) Four pairs of long chromosomes (3.2 μ).
2) Nine medium-sized chromosomes (2.5 μ).
3) Two pairs of short chromosomes (1.5 μ).

Six chromosomes are found to bear secondary constrictions. The detailed study of the chromosome morphology from several plates reveals the following types (Fig. 18).

Type B — One pair of long chromosomes each having two constrictions, primary and secondary, one in the submedian position and the other in a nearly subterminal position at the distal end of the longer arm (3.2 μ).

Type C — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one in the nearly submedian

Fig. 17-18 a — *C. decumana* cv. "Monster Kalsia" — Normal somatic metaphase (2 n=21), idiogram and variation metaphase with 9 chromosomes.

position and the other located in the middle of the longer arm (3.2 μ).

Type E — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one nearly median and the other nearly submedian in position at the other end of the longer arm (3.2 μ).

Type F — One pair of long chromosomes having nearly submedian primary constrictions (3.2 μ).

Type G — Seven medium sized chromosomes slightly varying in size having nearly submedian primary constrictions (2.5 μ).

Type H — One pair of medium-sized chromosomes having median primary constrictions (2.5 μ).

Type I — One pair of short chromosomes having nearly subterminal primary constrictions (1.5 μ).

Type J — One pair of short chromosomes having nearly median primary constrictions (1.5 μ).

Apart from the normal number, some nuclei showed 2 n 9 chromosomes (Fig. 18 a).

6. *Citrus decumana* Murr. cv. "Red fleshed"

The normal chromosome number of the species was found to be 2n = 18 (Fig. 19). Size difference is marked and on its basis the chromosomes can be divided under the following general groups:

1) Three pairs of long chromosomes (3.5 μ-3.2 μ).
2) Three pairs of medium sized chromosomes (1.8 μ-1.6 μ).
3) Three pairs of short chromosomes (1 μ).

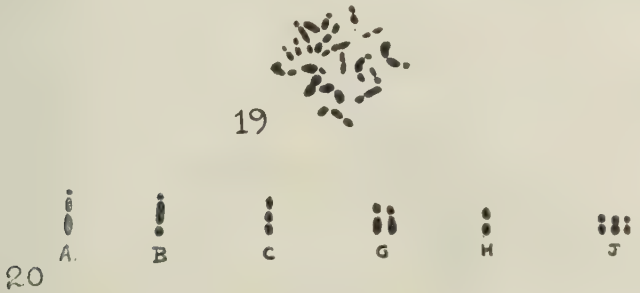


Fig. 19-20 — *C. decumana* cv. "Red fleshed" — Somatic metaphase (2n = 18) and idiogram respectively.

Six chromosomes are found to bear secondary constrictions. Detailed study of the chromosome morphology as made from metaphase plates reveals the following types (Fig. 20):

Type A — One pair of long chromosomes each having two constrictions primary and secondary, one in the median and the other in the subterminal positions (3.5 μ).

Type B — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one nearly submedian in position and the other nearly subterminal at the distal end of the longer arm (3.2 μ).

Type C — One pair of long chromosomes each having two constrictions, primary and secondary, one in the nearly submedian position and the other located in the middle of the longer arm (3 μ).

Type G — Two pairs of medium-sized chromosomes each having a primary constriction at the nearly submedian position (1 μ-1.6 μ).

Type H — One pair of medium-sized chromosomes each having a median primary constriction (1.6 μ).

Type J — Three pairs of short chromosomes, slightly varying in size, having primary constrictions at the nearly submedian to nearly median positions (1 μ).

7. *Citrus decumana* Murr. cv. "White fleshed"

The normal chromosome number of the species was found to be 2n = 18 (Fig. 21). Size difference is present, the chromosomes

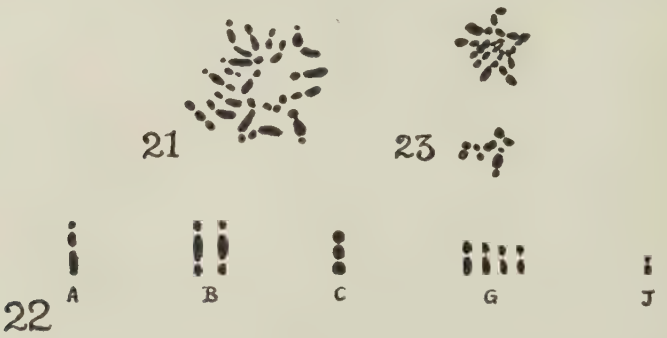


Fig. 21-23 — *C. decumana* cv. "White fleshed" — Normal somatic metaphase (2n = 18), idiogram and nucleus showing unequal separation of 13 and 5 chromosomes in anaphase respectively.

forming a graded series. The chromosomes are divisible into the following groups on the basis of their relative size:

1) Four pairs of long chromosomes (3 μ-2.5 μ).
2) Four pairs of medium-sized chromosomes (2 μ-1.6 μ).
3) One pair of short-sized chromosomes (1 μ).

Of them, eight are seen to bear secondary constrictions. Detailed study of the chromosome morphology as made from several metaphase plates reveals the following types (Fig. 22):

Type A — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one median and the other nearly subterminal in position (3 μ).

Type B — Two pairs of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one nearly submedian in

position and the other in the nearly subterminal position at the distal end of the longer arm (3 μ).

Type C — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one nearly submedian in position and the other located nearly in the middle of the longer arm (2.5 μ).

Type G — Four pairs of medium-sized chromosomes, slightly varying in lenght, having nearly median to submedian primary constrictions (2 μ - 1.6 μ).

Type J — One pair of short chromosomes each having a nearly median primary constriction (1 μ).

In a few dividing cells unequal separation of 13 and 5 chromosomes in anaphase could be observed (Fig. 23).

8. *Citrus Limetta* Risso cv. "Elachi"

The normal chromosome number of the species was found to be 2n = 18 (Fig. 24). Size difference is marked and on its basis the chromosomes are divided into the following groups:

1) Four pairs of long chromosomes (2.8 μ).
2) Four pairs of medium-sized chromosomes (2.2 μ-2 μ).
3) One pair of short chromosomes (1.5 μ).

Six of the chromosomes are seen to bear secondary constrictions. Detailed study of the chromosome morphology reveals the presence of the following types (Fig. 25):

Type A — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one in the median and the other in subterminal position (3.2 μ).

Type C — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one nearly submedian in position and the other located nearly in the middle of the longer arm (2.8 μ).

Type E — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one in the nearly median and the other in the nearly subterminal positions at the distal end of the longer arm (2.8 μ).

Type F — One pair of long chromosomes each having a nearly submedian primary constriction (2.8 μ).

Type G — Three pairs of medium-sized chromosomes each having a nearly sub-median primary constriction (2.2 μ).

Type H — One pair of medium-sized chromosomes, each having a median primary constriction (2 μ).

Figs. 24-29 — *C. Limetta* cv. "Elachi" — Normal somatic metaphase (2n = 18); idiogram; variation metaphase with 9 and 16 chromosomes; somatic reduction with 9 and 9 (equal) separation; and unequal separation (12 and 8) with one lagging chromosome respectively.

Type J — One pair of short chromosomes having nearly sub-median primary constrictions (1.5 μ).

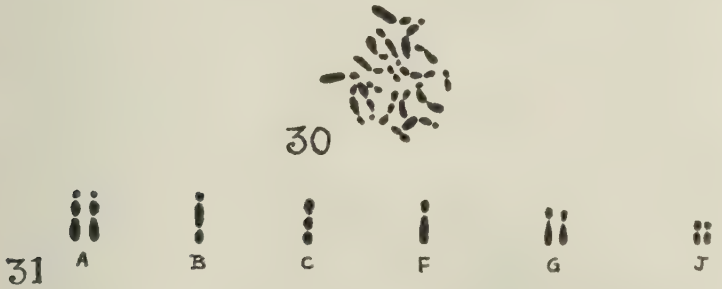
Variation from the normal number was also found in the root-tip cells, such as 2n = 9, 16 (Figs. 26, 27). Apart from this somatic reduction involving 9:9 separation at anaphase was observed (Fig. 28). Unequal separation of 12 and 8 chromosomes was also found in one of the plates having one chromosome lagging at the equator (Fig. 29).

9. *Citrus Limetta* Risso cv. "Sarbati"

The normal chromosome number of the species was found to be 2n = 18 (Fig. 30). Size difference is present and on its basis the chromosomes are divisible under the following groups:

1) Five pairs of long chromosomes (2.8 μ-2.5 μ).
2) Two pairs of medium sized chromosomes (2 μ-1.8 μ).
3) Two pairs of short chromosomes (1.2 μ).

Eight chromosomes are seen to bear secondary constrictions. From the study of the detailed chromosome morphology the chromosomes can be grouped under the following types (Fig. 31):



Figs. 30-31 — *C. Limetta* cv. "Sarbati" — Somatic metaphase (2n=18) and idiogram respectively.

Type A — Two pairs of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one median and the other nearly subterminal in position (2.8 μ).

Type B — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one submedian and the other nearly subterminal in position, at the distal end of the longer arm (2.8 μ).

Type C — One pair of long chromosomes each having two constrictions, primary and secondary, one nearly median in position and the other in the middle of the longer arm (2.5 μ).

Type F — One pair of long chromosomes with submedian primary constrictions (2.5 μ).

Type G — Two pairs of medium-sized chromosomes with submedian primary constrictions (2 μ-1.8 μ).

Type J — Two pairs of short chromosomes with median to submedian primary constrictions (1.2 μ).

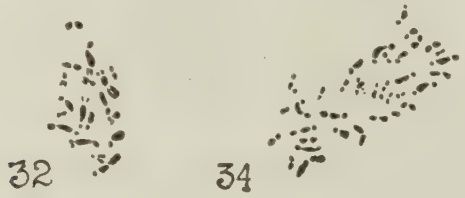
10. *Citrus microcarpa* Bunge

The normal chromosome number was found to be 2n 18 (Fig. 32). Size difference, in the chromosomes, is seen and accordingly they fall under the following groups:

1) Three pairs of long chromosomes (3 μ).
2) Three pairs of medium-sized chromosomes (2.2 μ-2 μ).
3) Three pairs of short chromosomes (1.2 μ-1 μ).

Of them six chromosomes are seen to possess secondary constrictions.

The study of the detailed chromosome morphology from different plates reveals the following types (Fig. 33):



Figs. 32-34 — *C. microcarpa* — Somatic metaphase (2n – 18), idiogram and variation metaphase with 36 chromosomes respectively.

Type A — One pair of long chromosomes, each having two constrictions, primary and secondary, one median and the other nearly subterminal in position (3 μ).

Type B — Two pairs of long chromosomes each having two constrictions, primary and secondary, one in the submedian position and the other nearly subterminal at the distal end of the longer arm (3 μ).

Type G — Two pairs of medium-sized chromosomes with submedian primary constrictions (2.2 μ-2 μ).

Type J — Two pairs of short chromosomes having median to nearly submedian primary constrictions (1 μ).

Apart from this, variation from the normal complement was observed. Tetraploid nuclei (2n — 36) were found associated with normal diploid ones (Fig. 34).

DISCUSSION

Previous report on the genus Citrus *and its allied genera*

Of the innumerable species of *Citrus* so far known in cultivation as well as in the wild condition, more than thirty species were worked out before the present investigation was undertaken (Frost, 1938; vide Darlington & Wylie, 1955). The genus, as is well known, is mainly characterised by apomictic development of the fruit, thus providing ample scope to the horticulturists in preserving the better cultivars.

The genus is characteristic in representing an unusually homogeneous assemblage of plants, which are morphologically and cytologically similar in a number of respects. Distinct polyploid series have been worked out in the genus (Krug, 1943; Lapin, 1937, etc.) all showing multiples of nine chromosomes. Except in the present report not a single case of chromosome numbers other than the multiple of nine in *Citrus* species has been reported. The most common diploid number of chromosomes is eighteen, which is found in most of the species. In addition to this 2n complements with twenty-seven, thirty-six, and forty-five chromosomes are also in record. There are cases such as *Citrus sinensis* Pers., *C. Natsudaidai* Hayata, etc. where both diploid, triploid as well as tetraploid individuals have been recorded. The former species even possesses a pentaploid form.

Such homogeneity in chromosome number is not only found in the genus *Citrus* but also in its allied genera of Rutaceae. The family Rutaceae is indeed remarkable in having such a natural assemblage of species.

It has already been pointed out in the introductory part of the paper, that this genus has often attracted the attention of the horticulturists and geneticists because of its economic importance. Considerable work on the grafting operations have been performed on its different species and both diploids and tetraploids have been used for the purpose. The species investigated in the present report are all raised from cuttings.

Basic numbers reported in the genus

Apparently it seems that nine is the possible basic number of the genus as a whole. No multivalent formation has been reported

in the so-called diploids. Recent investigations, however, reveal the presence of secondary association of bivalents in *Citrus grandis* Osbeck (Banerji, 1954). On the basis of secondary association the author concluded that the basic number of the species investigated by him is 3. On the strength of that finding it is quite clear that the number nine in the haploid set of the species investigated is due to derivation through allopolyploidy. In the light of the findings reported in *Citrus grandis* Osbeck, a thorough investigation into the meiotic details of all the species of *Citrus* seems to be highly desirable. In the present scheme of work all these different aspects have been included, the present report being just the initial part of the same.

Structural alterations of chromosomes and the evolution of species

The importance of the karyotypic changes in the origin of new taxonomic units, at the present state of our knowledge, needs no further emphasis. No doubt examples are there such as those of *Ribes*, *Streptocarpus*, etc. (vide Lawrence *et al.*, 1939; Darlington & Wylie, 1955; Gates, 1951; Sharma, 1956) where practically all the species exhibit a uniformity in the karyotype. These are regarded as examples where imperceptible changes must have taken place in the chromosome, which are responsible for the origin of new species and other taxonomic units. Cases of intermediate types are also found in *Lilium* (Stewart, 1948; Sharma, 1956) where species can be distinguished on the basis of their morphology and number of their nucleolar chromosomes. The differences no doubt are minute, but still they are detectable. Extreme cases are found in genera like *Crepis* etc. (Babcock, 1947; Sharma, 1956) where karyotypic characters are often considered as the distinguishing criteria of species. There is no denial of the fact that chromosomal changes, whether perceptible or imperceptible, are responsible for the origin of new species.

The perceptibility or imperceptibility of karyotypic changes depends upon the adequacy of the techniques that are applied for their studies. Recently, with the invention of a number of new improved methods (Tjio & Levan, 1950; Sharma & Bal, 1953; Sharma & Mookerjea, 1955; Sharma & Bhattacharyya, 1954) for the study of karyotypes, this difficulty has been much lessened. With

the application of these, evidences are gradually being accumulated to show that even inter-strain differences may depend on structural alterations of chromosomes, coming under the resolving power of the microscope. To mention only a few of such cases, the researches on Rye (Müntzing & Lima de Faria, 1949), Barley, etc. (Hagberg & Tjio, 1950) by Swedish workers, as well as on *Sorghum* (Sharma & Bhattacharjee, 1957), *Triticum* (Bhaduri & Mazumder, 1955) are to be noted. Before the modern techniques could be worked out, the origin of different strains in the above mentioned cases were supposed to be dependent on mainly imperceptible gene mutations.

The present investigation on the different species of *Citrus*, too, brings forth further evidences indicating the role of distinct structural changes of chromosomes, in the origin of new species. No doubt the number eighteen has been found as the somatic number of chromosomes in most of the cases, but karyotypes have not been found to be the same in any two species. Furthermore, even numerical alterations have been noted and records have been made of $2n = 21$, and $2n = 19$ chromosomes in two species. These may be considered as distinct indications of the role of both numerical and structural alterations of chromosomes in the origin of new species.

Of the ten taxa investigated in detail, seven show distinct eighteen chromosomes, possibly constituting the normal complement of the individual. Casually it may be mentioned that the common cultivar "Kagzi" of *Citrus acida aurantifolia*, investigations on which are progressing, also shows eighteen chromosomes in the somatic cells.

It is interesting to record that each and every species differs from the other in certain karyotypic details. Altogether 10 different types have been worked out in the genus, a number of types being absent in one species and present in the other. Furthermore, instead of being present in duplicate, some of the types are represented by two to three pairs in certain species with possibly the exclusion of another type. This karyotypic difference is even noticeable between different cultivars of the same species. For example "Red fleshed" cultivar of *Citrus decumana* possesses six types of chromosomes, namely, *A B C G H J* of which *G* and *J* are represented by two and three pairs respectively. On the other hand in the allied "Chinese" there are eight types of chromosomes

A B C D F G H J, in which *G* is represented by one pair and *J* by two pairs of chromosomes. The number of chromosomes with secondary constrictions also varies from cultivars to cultivars and also species to species as exemplified by three such pairs in "Red fleshed" *C. decumana* and four pairs in "Chinese" cultivar of *C. decumana*. How far all these constrictions are nucleolar in nature is yet to be tested.

Such chromosomal differences, even between different cultivars, clearly indicate the role structural alteration plays in the evolution of species. In absence of any meiotic data yet obtained, it is difficult to state whether such structural rearrangements have attained homozygosity or not. The results of such investigations will be reported in a later communication.

The different types of chromosomes noted in various *Citrus* species obviously do not necessarily represent any member of the original basic set. Obviously some of the types are the derivation of others and the number of types present in the original basic set must have been quite low as compared to the present day ones.

It is significant that Banerjie (1954) in *Citrus grandis* Osbeck recorded secondary association of bivalents during meiosis. His observation suggested that the basic number of chromosomes is three and thus the amphidiploid constitution of the plant was worked out. When such evidence has been obtained even in one species, it may not be different with others. However this is an issue which is under investigation.

Karyotypic alterations — both numerical and structural — their significance and mode of origin

Considerable amount of evidence of structural and numerical alterations in chromosome complement have been gathered in practically for each and every species. All of these show varying numbers of chromosomes and varying karyotypes within the same tissue of a single individual. Nuclei containing such variations in the complement are always present associated with the normal ones and there is no distinct zone of their occurrence. They occur quite at random, and no regularity until now could be worked out. For example in the *C. Limetta* cv. "Elachi" nuclei containing nine, sixteen and twenty-one chromosomes have been found,

associated with those containing eighteen chromosomes. Several nuclei, too, have been shown to contain the normal number, but different karyotypes. In such cases, as it is clear, the detection of the normal karyotype becomes a difficult task. In order to find out a solution to the problem, frequency data of the different types of nuclei have been taken and the one, which has been found to occur in the highest frequency, has been regarded as normal for the species. It is worth noting that KRUG & BACCHI (1943) reported varying numbers in individuals of "Tahiti" cultivar of *C. aurantifolia*. However, confirmatory evidences from meiotic data are to be gathered and observations so far carried out on meiosis indicate positive evidences of this assumption.

The question may be raised as to the mode of origin of the abnormalities in the somatic tissue. There is no doubt that the structural alterations involve mainly fragmentation and translocation of chromosomes. Evidences of fragmentation are clear. In some of the species, fragments could be recorded in some nuclei, for example in *Citrus acida aurantifolia* cv. "China". It may be noted that in a number of plates, chromosome ends having a fuzzy appearence no doubt indicate the presence of breakages and their heterochromatic nature. It is not at all unlikely that heterochromatic regions are involved to a great deal in fragmentation and translocation processes. It may be pointed out, however, that in such processes the entire chromatin matter of the cell remains the same, involving specially rearrangements.

As regards the origin of the numerical alterations, quite likely non-disjunction plays the most significant role. As the increase or decrease does not involve in most cases the entire haploid set, the failure of regular separation of some of the chromosomes to two poles seems to be the only alternative mode of their origin. Similar types of numerical alterations had been noted in a number of previous other cases, but in most of them the entire chromosome set was involved which indicated polyploidy. In *Zephyranthes mesocloa* (SHARMA & GHOSH, 1954), however, nuclei in the same tissue, were noted with varying numbers, all being multiples of six. As six was found to be the basic number of the species, variation in the particular case was supposed to involve endomitotic duplication of the six basic sets of chromosomes.

In the present case, excepting the occurrence of few 4 n cells in *Citrus microcarpa*, as no regularity of the type of *Zephyranthes*

mesocloa is noticeable, non-disjunction, as well as lagging, seems to be the only way through which such numerical variations arise. Evidence of non-disjunction resulting in varying numbers in two poles, as well as the phenomenon of lagging have been noted in the "White fleshed" cultivar of *C. decumana* and the "Elachi" cultivar of *C. Limetta*, respectively. It is worthy of note that clear somatic reduction of chromosomes, resulting into nine and nine chromosomes in two poles of somatic cells has been observed in *C. Limetta* cv. "Elachi".

It is possible, therefore, on the basis of these facts and observed evidence, that non-disjunction, lagging and somatic reduction play the most important roles in bringing about numerical alterations in the somatic cells. For structural alterations, however, fragmentation and translocation seem to be the most important processes.

Significance of such alterations in relation to the method of propagation of a species

The question may arise as to what is the cause of such apparent disbalance in the somatic tissue. In order to gain an understanding of its significance, it must be decided first of all whether this particular behaviour should be considered as an abnormality or not.

So far as our experience goes, this variation of chromosome complement in the somatic tissue occurs regularly in all vegetatively propagated plants (Sharma & Das, 1954; Mookerjea, 1955, a, b; Sharma, 1956). Considerable amount of data have been collected on this aspect and the significance too has been pointed out. In more than two hundred species of vegetatively propagated plants so far investigated, such somatic variations have been found to be universal. No regularity could until now be worked out and apparently it seems that they occur at random. When it is observed as such a common feature in all cases, it appears that there must be some regularity at certain level not yet explored. Considerable scope of work is still left in this direction and more investigations are desired.

It has been emphasised that such altered nuclei enter into the growing regions, responsible for the formation of new shoots, and then give rise to new forms at a single stroke in evolution. Concrete evidences of such behaviour have been brought forward in *Caladium bicolor* (Sharma & Das, 1954) and a number of other species

too. It is significant, however, that the data so far collected are all centered around plants belonging to the monocotyledonous group.

The genus *Citrus*, though a member of the dicotyledons, is normally cultivated through vegetative means by horticulturists. The method of propagation of monocotyledonous plants is also vegetative, that is, through bulbs, rhizomes, etc. Therefore we find that so far as propagation is concerned, the species of *Citrus* investigated and the monocotyledons, have one feature in common and that is less dependence on sexual reproduction. The method of reproduction is well known, either through grafting or through cuttings. It will therefore be not unreasonable to assume that such alterations also play a significant role in the origin of new species in *Citrus* as in case of other vegetatively reproducing plants. Obviously therefore we consider that the alterations, which occur spontaneously in the somatic tissue, survive in such plants, which are propagated through vegetative means, thus providing ample scope for the origin of new forms. It may be considered that this is an adaptation to their method of propagation. Obviously in plants reproducing mainly through sexual means, such alterations are possibly eliminated by selection. Investigations on other dicotyledonous plants with similar method of propagation are also yielding confirmatory results in this laboratory.

Normally no doubt the possibility of the survival and entrance into daughter shoots of the structural alterations, are more than the numerical ones. This is specially evident in a majority of the *Citrus* species which have the same number of chromosomes ($2n = 18$) but different karyotypes. But the presence of two species even with other numbers in *Citrus* evidently indicates that in certain cases numerical alterations, too, survive and may be responsible for the evolution of new forms. Evidences of such behaviour are also available in certain other plants. The report of different chromosome numbers in a single species by different authors is also quite significant in this connection. It may easily be presumed that individuals with different numbers may also exist in a species which owes their origin to such somatic alterations. Lastly it may be emphasized once more that the idea of the fixity of chromosome number of each and every cell of an organism is not necessarily applicable (Sharma & Sharma, 1956). Extreme caution is necessary in determining the chromosome number of plants reproducing specially through vegetative means.

SUMÁRIO

(ELABORADO POR L. AZEVEDO COUTINHO)

O presente estudo diz respeito à constituição numérica de cromosomas e suas características morfológicas em dez diferentes cultivares de diversas espécies do género *Citrus* observadas nos complexos somáticos de vértices vegetativos de raízes.

As observações dos números diploides de cromosomas e de variações encontradas em células de um mesmo indivíduo, apresentam-se resumidamente no seguinte Quadro:

Espécies	Cultivares	Número 2n de cromosomas	
		Normal	Variações
C. acida aurantifolia PERS.	"China"	18	19+1F; 18+2F; 17+2F e 17+1F
	"Columbia"	19	13; 15+1F.
	"Gora"	18	
C. decumana MURR.	"Chinese"	18	19; 20; 18 mas com diferentes tipos morfológicos
	"Monster Kalsia"	21	9
	"Red fleshed"	18	
	"White fleshed"	18	disjunções anafásicas de 13 e 5
C. Limetta RISSO	"Elachi"	18	9; 16. Disjunções de 12 e 8+1 retardatário
	"Sarbati"	18	
C. microcarpa BUNGE		18	Núcleos tetraploides (4n=36), associados com os diploides

Foram, também, identificados os diversos tipos de cromosomas, inclusivé os S. A. T., pelas suas dimensões, características morfológicas e localização das constrições.

Discute-se qual o verdadeiro número básico de cromosomas do género, até recentemente considerado como 9. No entanto, atendendo às observações de BANERGIE (1954), que notou associações secundárias de bivalentes, considera-se que o número básico

das espécies agora observadas seja 3 e que o género tenha uma origem amphidiploide.

São discutidas as variações de número e de estrutura como base de origem de novas espécies, embora se reconheça a ausência da contribuição do estudo da meiose do material, que será apresentada mais tarde.

Estas variações de número, dentro de um mesmo tecido de um único indivíduo, são atribuídas a casos de não-disjunção e de redução somática. Referem-se as observações de outros autores que permitem considerá-las como casos regulares nas plantas de propagação vegetativa, contribuindo para a ideia de desempenharem papel significativo na evolução destas espécies. Nas plantas de reprodução sexuada, este tipo de evolução seria eliminado por uma selecção natural durante a fecundação.

Deste modo, torna-se necessária uma cautelosa atenção nas determinações dos números de cromosomas, especialmente, nas plantas de propagação vegetativa.

BIBLIOGRAPHY

BABCOCK, E. B.

1947 The genus *Crepis*. Part I. The taxonomy, phylogeny, distribution and evolution of *Crepis*. *Univ. of Calif. Publ. Botany*, **21**: 1-197.

BANERJI, I.

1954 Morphological and cytological studies on *Citrus grandis* Osbeck. *Phytomorphology*, **4**: 390-396.

BHADURI, P. N. & MAZUMDER, B. R.

1955 An improved pollen grain smear method for wheat. *Stain Technology*, **30**: 93-98.

DARLINGTON, C. D. & WYLIE, A. P.

1955 *Chromosome Atlas of flowering plants*. George Allen & Unwin Ltd., London.

FROST, H. B.

1938 The genetics and cytology of *Citrus*. *Curr. Sci.* Spec. no.: 24-27.

FURUSATO, K.

1952 Tetraploidy in *Citrus*. Abnormal growth of *Citrus* trees caused by deviating chromosome numbers in grafting stocks. *Annual Rep. Nat. Inst. Genetics Japan*, **3**:

GATES, R. R.

1951 The taxonomic units in relation to genetics and gene ecology. *Amer. Nat.* **85**: 31-50.

HAGBERG, A. & TJIO, T. H.

1950 Cytological localization of translocation point for the Barley mutant «Erectoides 7». *Hereditas*, **36**: 487-491.

KRUG, C. A.
1943 Chromosome numbers in the sub-family Aurantioideae with special reference to the genus *Citrus*. *Bot. Gaz.* **104**: 602-611.
——— & BACCHI, O.
1943 Triploid varieties of *Citrus*. *J. Heredity*, **34**: 276-283.
LAWRENCE, W. J. C., SCOTT-MONCRIEFF, R. & STURGESS, V. C.
1939 Studies on *Streptocarpus*. *J. Genet.* **38**: 299-306.
LAPIN, W.
1937 a & b *Trud. Vsesoj. nauch, issled. Inst. vlzan sub-trop.* **1**: 1 & 69.
MOOKERJEA, A.
1955 Cytology of Amaryllids as an aid to the understanding of evolution. *Caryologia* **7**: 1-71.
1955 Cytology of different species of Aroids with a view to trace the basis of their evolution. *Caryologia*, **7**: 221-291.
MÜNTZING, A. & LIMA DE FARIA, A.
1949 Pachytene analysis of standard fragments and large iso-fragments in Rye. *Hereditas*, **35**: 253-256.
SHARMA, A. K.
1956 A new concept of a means of speciation in vegetatively reproducing plants. *Caryologia*, **9**: 93-130.
——— & BAL, A. K.
1953 Coumarin in chromosome analysis. *Stain Techn.* **28**: 255-257.
——— & BHATTACHARJEE, D.
1957 Cytogenetical studies in Sorghum. *Cytologia*, **7** (in press).
——— & BHATTACHARYYA, N. K.
1954 Treatment of root-tips in phenols for the study of karyotypes. *Curr. Sci.* **23**: 232-233.
——— & DAS, N. K.
1954 Study of karyotypes and their alterations in Aroids. *Agron. Lusit.* **16**: 24-48.
——— & GHOSH, C.
1955 Further investigations on the cytology of the family Amaryllidaceae and its bearing on interpretation of its phylogeny. *Genet. Iber.* **6**: 71-100.
——— & MOOKERJEA, A.
1955 Paradichlorobenzene and other chemicals in chromosome work. *Stain Tech.* **30**: 1-7.
——— & SARKAR, S. K.
1954 A new technique for the study of chromosomes of Palms. *Nature*, **176**: 261.
——— & SHARMA, A. (née MOOKERJEA)
1956 Fixity in chromosome number of Plants. *Nature*, **177**: 335-336.
STEWART, R. N.
1948 The morphology of somatic chromosomes in *Lilium*. *Amer. J. Bot.* **34**: 9-26.
TJIO, A. & LEVAN, J. H.
1950 The use of oxyquinoline in chromosome analysis. *An. Estac. Exp. Aula Dei*, **2**: 21-64.

TREVOS AUTOTETRAPLOIDES

I. O CASO DE *TRIFOLIUM RESUPINATUM* L. SSP. *SUAVEOLENS* (WILLD.) DINSM.

POR *J. LEÃO FERREIRA DE ALMEIDA*
(Estação Agronómica Nacional)

DESDE que se verificou, em determinadas plantas, que alguns graus de poliploidia conferiam aos respectivos poliploides reais vantagens quanto a produção, vigor e sobrevivência em climas e meios adversos, em contraste com os seus diploides (HAGERUP, 1928, 1932; MÜNTZING, 1936; FLOVIK, 1940; LÖVE & LÖVE, 1942, 1943, 1949, 1956; STEBBINS J.r, 1950; RODRIGUES, 1953), a obtenção artificial de poliploides passou a ser um objectivo dos trabalhos de melhoramento. Procura-se, desta forma, tirar novo partido de velhas plantas, levá-las a novas regiões.

A produção artificial de poliploides, além do interesse científico de pesquiza da acção e interacção de genes, do estudo das perturbações meióticas resultantes e sua influência na fertilidade, e de aspectos de taxonomia, passou, assim, a ter alto interesse económico.

Para mostrar a importância que os povos que se preocupam com a valorização da sua agricultura atribuem aos poliploides, basta dizer que a maior parte das plantas de valor agrícola da Suécia foram convertidas em poliploides nos primeiros cinco anos que decorreram após a introdução do uso da colquicina na produção de poliploides, feita por BLAKESLEE & AVERY, em 1937. Em outros países aconteceu coisa semelhante. Na verdade, sabe-se que muitas das espécies de valor económico-agrícola são poliploides naturais (trigo, cevada, cana sacarina, tabaco, algodão, etc.).

Acontece, por vezes, que os diploides de que se parte para a produção de poliploides já atingiram o seu melhor equilíbrio génico e, nestes casos, a poliploidia deixa de ter as vantagens que se desejavam.

No melhoramento de forragens, em que o principal objectivo a atingir é a obtenção de mais massa verde, tenra e de rápido crescimento, mais rica em princípios nutritivos, apetecida pelos gados, está indicada a produção de poliploides, desde que os complexos cromosómicos dos respectivos diploides ainda não reunam o seu melhor arranjo génico.

Para algumas espécies forraginosas pode constituir, ainda, objectivo de interesse torná-las aptas a serem cultivadas em territórios dotados de outras características agro-climáticas.

Marques de Almeida (1943) seleccionou, em 1940, entre plantas provenientes de sementes oriundas do Afeganistão e semeadas no inverno de 1939, linhas de *Trifolium resupinatum* L. ssp. *suaveolens* (Willd.) Dinsm. que, pela sua óptima adaptação a algumas regiões do País, constituem hoje, aí, uma das nossas melhores forragens. A forma diploide deste trevo chega a produzir, por hectare, 80000 kg (Marques de Almeida, l. c.) o que constitue apreciável quantidade. Tem, ainda, o mérito de poder ser semeada, sem qualquer inconveniente para a cultura, nas terras de arroz, no período que decorre entre Outubro e Março, constituindo um aproveitamento suplementar e muito valioso destas terras pela massa verde que produz, sendo ainda de considerar o benefício resultante da cultura de uma leguminosa.

O conhecimento de que algumas espécies de *Trifolium*, poliploides artificiais, têm características mais recomendáveis, sob o ponto de vista forraginoso, do que os correspondentes diploides (Levan, 1942; Julen, 1949; Levan & Müntzing, 1952), levou-nos a tentar induzir a poliploidia em cultivares de *T. resupinatum* L. ssp. *suaveolens* (Willd.) Dinsm. ($2n = 16$) com o objectivo não só de melhorar as suas qualidades nutritivas e de acréscimo na produção de massa forraginosa mas, ainda, de as dotar de características genéticas que permitam a sua cultura em novas localidades. Sabe-se, com efeito, que as espécies poliploides do género *Trifolium* têm mais possibilidades de sobrevivência em climas e meios adversos do que as diploides (Senn, 1938). Simultaneamente, interessámo-nos ainda pelo aspecto teórico da poliploidização.

Num desenvolvimento da ideia, e por idênticas razões, foram incluídos no mesmo esquema de tratamento: *T. alexandrinum*, *T. repens*, *Lupinus luteus* e *L. albus*, com resultados positivos, a que se fará referência noutro trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Em Outubro de 1953 foram postas a germinar, em placas de Petri, a 25° C, sementes das linhas 12253 e 12254 de *T. resupinatum* L. ssp. *suaveolens* (Willd.) Dinsm. da colecção de forragens da E.A.N..

QUADRO I

Efeitos da acção da colquicina, em concentrações e tempos variáveis, sobre meristemas caulinares de *T. resupinatum* L. ssp. *suaveolens* (Willd.) Dinsm.

Números das linhas	Colquicina %	Plantas tratadas	Duração do tratamento	Resultados			
				2n	Mixo.	4n	Plantas mortas
12253	0,3	10	60 min.	10	—	—	—
		10	2 h	9	1	—	—
		10	3 h	8	1	1	—
		10	4 h	6	2	—	2
12253	0,5	10	60 min.	8	2	—	—
		10	2 h	6	2	1	1
		10	3 h	2	3	4	1
		10	4 h	4	1	1	4
12253	0,7	10	60 min.	8	2	—	—
		10	2 h	5	1	2	2
		10	3 h	4	2	1	3
		10	4 h	5	1	—	4
12254	0,5	10	60 min.	9	1	—	—
		10	3 h	4	3	3	—
		10	4 h	4	2	1	3

Decorridos alguns dias após a germinação, os meristemas vegetativos do caule eram colocados em contacto com soluções de colquicina de concentrações variáveis e em tempos diferentes, conforme mostra o Quadro I, introduzindo as plântulas nos furos de uma placa circular feita de papel parafinado, placa esta que se colocava na solução de colquicina dentro das placas de Petri de modo a deixar apenas a parte aérea em contacto com a solução.

Para obstar à dessecação das raizes cobriam-se estas com papel de filtro humedecido. Seguidamente, as plântulas eram lavadas em água corrente depois do que eram plantadas em vasos com terra,

na estufa. Passado tempo, quando estas plantas estavam em franco desenvolvimento, colhiam-se vértices vegetativos do caule e faziam-se esfregaços com orceína acética a fim de averiguar quais as plantas em que havia sido induzida a duplicação de cromosomas.

As plantas em que se verificava ter havido multiplicação de cromosomas eram mantidas em cultura, na estufa; todas as outras eram eliminadas. Algumas das plantas transferidas para a estufa morreram passado pouco tempo.

Das plantas que sobreviveram até à produção de semente, colhiam-se as sementes em separado, ramo por ramo, na mesma planta. No ano seguinte estas sementes eram semeadas em separado e, como provinham, algumas vezes, de ramos mixoploides, resultavam plantas di- e tetraploides. Eliminávamos todas as diploides com esta origem mantendo, apenas, todos os anos, as diploides testemunhas. No terceiro ano já só resultaram tetraploides.

Em todas estas plantas do terceiro ano foi confirmada a constituição tetraploide no decurso do ciclo vegetativo, pois de todas se colheu material para estudo da meiose. À semelhança dos anos anteriores, logo que as sementes estavam maduras, colhiam-se, em separado, as de cada planta.

No quarto ano passaram estas sementes a ser semeadas ao ar livre, em duas localidades agro-climáticas diferentes: Oeiras e Alcobaça.

OBSERVAÇÕES

Aspectos morfológicos

Como é sabido, quando se procede a tratamentos com colquicina para induzir a poliploidia, não só algumas plantas tratadas não sofrem duplicação cromosómica como ainda, aquelas em que tal duplicação se deu, normalmente, não são poliploides em toda a sua extensão mas sim, apenas, nalguns sectores.

Como a colquicina tem uma acção estimulante, é difícil, à simples vista, distinguir as novas poliploides das plantas que permaneceram diploides, após o tratamento. A observação corrente das dimensões dos estomas e do pólen como teste para identificar os poliploides falha, muitas vezes, por aquela razão, e só a determinação do número de cromosomas das ramificações provenientes de células do meristema tratado é garantia segura de ter havido indução de poliploidia. Foi esta a técnica que seguimos,

tendo tido, por isso, necessidade de fazer muitas centenas de observações microscópicas.

Entre as novas poliploides e as diploides testemunhas vão-se evidenciando características morfológicas externas que as distinguem:

— logo de início se percebe um maior vigor para as poliploides, com os caules, os pecíolos e os folíolos mais túrgidos, mais grossos, maiores e de um verde mais intenso;

— os folíolos das plantas tetraploides são mais carnudos e de maiores dimensões do que os das diploides; adquiriram, além disso, uma forma obovada mais pronunciada e são menos serrados (Estampa III, Fig. 1);

— as plantas tetraploides permanecem por mais tempo verdes e em crescimento, atingindo dimensões superiores às das diploides; entram em floração também mais tarde;

— as inflorescências, as infrutescências e as sementes dos trevos tetraploides são maiores do que as dos diploides.

Os caules atingiram grande estatura, na estufa, durante o período de floração, havendo plantas que ultrapassaram 2,5 m de altura. No talhão experimental de Alcobaça, desenvolveram-se folhas com mais de 50 cm de pecíolo e com folíolos de $5{,}9 \times 7$ cm (Est. III, Fig. 1). As maiores dimensões de folíolos registadas em plantas de estufa foram de $6 \times 7{,}3$ cm.

No que respeita a poder de regeneração dos trevos tetraploides, apenas podemos referir o comportamento das plantas C_4 do talhão de Alcobaça, único em que se fizeram cortes: as plantas revelaram boa rebentação ao corte, rápida e vigorosa regeneração (Est. IV, Fig. 1 e 2) ramificando-se abundantemente, a partir da base, facto de grande importância quando consideramos estas plantas do ponto de vista forraginoso.

Estes trevos comportaram-se, em estufa, como totalmente alogâmicos. Com efeito, vários ensaios de autofecundação a que procedemos resultaram sempre infrutíferos o que não acontecia nas inflorescências visitadas por abelhas. As plantas 4n conservaram, se não avolumaram, o aroma típico deste trevo o qual muito contribui, assim como as pétalas maiores e mais intensamente coloridas, para atrair as abelhas — agentes polinizadores indispensáveis nestas plantas — em grande quantidade.

As sementes das plantas tetraploides são maiores do que as das diploides (Est. III, Fig. 2) tendo-se verificado que, em amostras

de 1000 sementes de duas linhas da C_3, os pesos eram sensìvelmente duplos dos das correspondentes diploides (Quadro II).

QUADRO II

Plantas	Linhas	Peso de 1000 sementes (g)
Diploides	12253	1,3955
	12254	1,5215
Tetraploides	330-2	2,5910
	331-2	2,9967

O aumento de reservas germinativas em sementes tão pequenas, como consequência da poliploidização, é da maior importância, pois lhes confere melhores possibilidades de sobrevivência em condições agro-climáticas desfavoráveis.

Aspectos citológicos

a) Plantas diploides

Mitose: A determinação do número de cromosomas foi feita em esfregaços de raiz e de meristemas caulinares tendo-se encontrado 16 cromosomas somáticos confirmando, assim, o número encontrado para a espécie, pela primeira vez, por Karpetschenko, em 1925.

Em todas as lâminas observadas contámos sempre 16 cromosomas pequenos, de constrição submediana ou terminal (Fig. 1, A). Dificilmente se identificam cromosomas satelitíferos.

Meiose: Na meiose, quer em profase quer em metafase I, encontrámos sempre 8 II; apenas em raros casos vimos 2 univalentes.

As diversas fases da meiose decorrem com a maior regularidade; não encontrámos pontes nem micronúcleos. Alguns cromosomas mais vagarosos em dividir-se acabam por atingir os polos a tempo de serem incluídos nos núcleos telofásicos. De uma meiose tão regular resulta elevada percentagem de miscrósporos perfeitos. Tivemos ocasião de contar cerca de 95 % de grãos de pólen normal. A percentagem de fertilidade, porém, é bastante mais baixa.

O número que determinámos, nas plantas testemunhas, foi de 79,5%, conforme mostra o Quadro III.

b) Plantas tratadas

Mitose: Fizeram-se várias colheitas de meristemas caulinares no decurso do desenvolvimento das plantas tratadas com colquicina em que a primeira observação citológica revelava ter havido duplicação da sua constituição cromosómica. Estas plantas, total ou parcialmente poliploides, eram separadas e mantidas em observação.

Fig. 1 — *T. resupinatum* L. ssp. *suaveolens* (WILLD.) DINSM.. Placas equatoriais em células de meristemas caulinares: A) de uma planta diploide (2n = 16); B) de uma planta tetraploide (4n = 32). Carnoy-Orceina acética; ca. 3500 ×.

No decurso destas observações verificou-se uma maior frequência de plantas mixoploides (Quadro I). Nestas plantas diferenciam-se sectores poliploides e diploides com formação ulterior de ramos 4n e 2n provenientes da mixoploidia. Nos ramos tetraploides e até final da meiose iam surgindo células diploides de mistura com as tetraploides. Na mesma inflorescência encontrámos células 4n e células 2n e, em alguns casos, encontrámos, a partir da mesma flor, C. M. P. 4n e 2n mostrando a existência de quimeras sectoriais resultantes da mixoploidia. Estes aspectos repetiam-se até a formação das células sexuais.

Como o Quadro I mostra, o tratamento com o alcaloide deu também origem a algumas plantas que eram totalmente tetraploides. A Fig. 1, B e a Est. I, Fig. 1 dão-nos uma ideia do complexo cromosómico dos trevos tetraploides (4n = 32 cromosomas).

Apareciam em mitose os típicos c-pares, ao mesmo tempo que contracção, aglutinação e mais intensa coloração dos cromosomas. No segundo ano e seguintes desapareceram os aspectos de mixoploidia e de aglutinação, estabilizando-se os tetraploides.

Na C_2 apareceu uma planta octoploide (Est. I, fig. 2) que apenas viveu alguns dias.

Apesar das plantas tetraploides se desenvolverem lado a lado com as diploides testemunhas, não apareceu um único caso de triploidia. Este facto, a verificar-se em cultura, ao ar livre, seria de incontestável valor prático.

Meiose: A meiose foi estudada em diversas plantas da C_1, da C_2 e da C_3. As exíguas dimensões dos cromosomas dificultam um estudo citológico pormenorizado referindo modos de associações primárias e descrição de figuras de paquitena.

Nos primeiros estados da profase até ao de paquitena os cromosomas encontram-se num emaranhado confuso sendo difícil individualizá-los. Nas diplotenas começa a contracção e já é possível separar todos os elementos e classificar as associações. Na diplotena representada na Fig. 3 da Est. I notam-se, distintamente, 8 IV. Tão elevado número e a frequência com que se formam os tetravalentes, não seria possível se se não tratasse de plantas com um complexo cromosómico constituído por elementos de pequenas dimensões. Esta figura mostra, ainda, um predomínio de tetravalentes em anel (neste caso 5). Como é sabido, da segregação deste tipo de tetravalentes resultam, normalmente, dois centrómeros para cada polo, facto da maior importância para que a meiose decorra com regularidade.

Na diacinese e particularmente em metafase, há forte repulsão dos cromosomas para a periferia do núcleo (Est. I, Fig. 3 e 4).

Nas diacineses observadas pudemos distinguir também, de 1 a 8 IV (máximo possível), alguns trivalentes e univalentes, embora raros (Est. I, Fig. 3, 4 e 5), e, em alguns casos, predomínio de bivalentes com alguns tetravalentes (Est. I, fig. 6).

Em vistas de topo da metafase ainda é fácil identificar as associações (Est. II, Fig. 1). Em vistas de perfil os cromosomas dispõem-se, normalmente, em placa.

Por via de regra as anafases têm um aspecto regular sendo frequente encontrar-se, em cada grupo anafásico, 16 cromosomas (Est. II, Fig. 2).

Na divisão heterotípica encontrámos alguns univalentes em divisão assincrónica (Est. II, Fig. 3) originando retardatários de que, por vezes, vinham a resultar micronúcleos, embora em raros casos. Poucas vezes apareceram pontes (Est. II, Fig. 4). Os nucléolos

desapareciam nos primeiros estados da profase para só tornarem a ser vistos no final da telofase II.

Nas Est. I, Fig. 3, 4, 5 e 6, e Est. II, Fig. 1, podem ver-se várias associações de cromosomas, respectivamente: 8 IV; 8 IV; 5 IV + + 1 III + 4 II + 1 I; 3 IV + 10 II; e 4 IV + 8 II.

Não obstante a diversidade de associações primárias, a divisão homotípica decorre com poucas irregularidades. Isto resulta, certamente, não só da elevada frequência de bivalentes como ainda do tipo de segregação dos tetravalentes em anel. Nos casos em que apareciam univalentes, estes, quando se dividiam na primeira divisão, a tempo de serem englobados nos grupos telofásicos, não se dividiam na II e comportavam-se como retardatários; os que não se dividiram a tempo de serem incluídos nos grupos polares constituíam micronúcleos que vinham originar alguns dos casos de microcistos observados. O mais frequente, porém, era os univalentes dividirem-se na divisão homotípica e então comportarem-se normalmente, tudo se conjugando para que a divisão homotípica se apresentasse com o aspecto de uma divisão normal (Est. 2, Fig. 6).

Com efeito, quando a separação dos cromosomas permitia uma contagem exacta, era fácil distinguir 16 elementos em cada placa metafásica (Est. II, Fig. 5) e em ana-telofase podiam contar-se 4 grupos de 16 cromosomas (Est. II, Fig. 6).

Segue-se a citocinese com a formação de 4 micrósporos; em raros casos se viam «tétradas» com maior número de micrósporos. A percentagem de grãos de pólen aparentemente normais, é muito elevada (80 a 90 %, conforme as plantas), o que mostra que as associações primárias e os univalentes, de facto, pouco prejudicaram a microsporogénese.

Admitindo que na formação dos óvulos se passam idênticas irregularidades meióticas, seria de esperar formarem-se zigotos e aparecerem plantas aneuploides. Tal não se encontrou, o que pode ser atribuído ao aborto dos gametas e zigotos de constituição anormal, sendo apenas viáveis os euploides.

Embora não tenhamos feito determinações numéricas, os três anos de observações do comportamento meiótico destes autotetraploides deixam-nos a impressão de que a meiose decorre, neste terceiro ano, com mais normalidade do que o que acontecia nos anos anteriores. O elevado número de sementes produzidas por planta parece confirmar esta suposição. É, na verdade, muito

provável que os gametas inviáveis vão sendo cada vez em menor número, de geração para geração, por selecção natural.

Fertilidade

A inviabilidade ou mesmo uma diminuta produção de sementes nas formas autotetraploides pode ser razão suficiente para que, a despeito de benefícios trazidos para outras características pela poliploidização, como seja um acréscimo no vigor vegetativo, estas novas formas tenham de ser regeitadas. Em algumas espécies de trevos verifica-se, de facto, uma acentuada diminuição de fertilidade em consequência da poliploidização, como adiante veremos.

QUADRO III

Número médio de vagens e de sementes por capítulo em plantas das linhas diploides e tetraploides de *T. resupinatum* L. ssp. *suaveolens* (WILLD.) DINSM.

Linhas	Vagens por capítulo (média)	Sementes por capítulo (média)	Fertilidade %
2n	44,4	35,3	79,5
4n:			
324	36,3	19,5	53,7
325	39,5	26,4	66,8
326	31,3	21,6	69
327-1	36,2	20,4	56,3
327-2	34,1	20,8	60,9
328-1	32,6	17,8	54,6
328-2	29,4	16,4	55,7
329	33,6	19,9	59,2
330-1	33,8	21,1	62,4
330-2	36,3	20	55,4
331-1	27,8	12,9	46,4
331-2	33,5	14,7	43,8
332	31,1	20	64,3
333	34,5	14,3	41,4
339	37,1	18,8	50,6

No Quadro III apresenta-se o número médio de vagens e de sementes por capítulo nas diversas linhas tetraploides do trevo em estudo e indicam-se os mesmos elementos em relação à forma diploide.

A observação deste Quadro mostra-nos que a poliploidização motivou, nas tetraploides, uma redução do número de vagens e

de sementes por capítulo, em relação às formas diploides. Assim, enquanto as diploides tinham uma média de 44,4 vagens por capítulo, a que correspondia uma média de 35,3 sementes ou seja uma percentagem de fertilidade de 79,5 %, nas formas tetraploides a média de vagens por capítulo variava entre 27,8 e 39,5 e a média de sementes por capítulo oscilava entre 12,9 e 26,4; a percentagem de fertilidade nos autotetraploides estava compreendida entre 43,8 e 69. Verifica-se, portanto, uma quebra na produção de vagens por capítulo compreendida entre 11 e 37,6 % e uma redução na produção de sementes, em relação às diploides, compreendida entre 25,2 e 63,4 %.

O Quadro III mostra ainda que cerca de metade das linhas tetraploides tem fertilidade superior a 60 % e que em apenas três linhas a fertilidade é inferior a 50 %. Caberá agora à selecção, natural e artificial, eliminar as formas portadoras de caracteres indesejáveis, no sentido de obter maior fertilidade, e mais massa verde.

O poder germinativo das sementes revelou-se variável de linha para linha, oscilando entre 75 e 100 %.

DISCUSSÃO

A indução de poliploidia com objectivos de melhoramento é mais prometedora quando as plantas, na sua forma espontânea, tenham um número cromosómico baixo e o seu valor económico resida principalmente no seu grande desenvolvimento vegetativo (Levan, 1942), característica por vezes dependente da poliploidia; em plantas com reprodução sexuada, como são os trevos, é ainda indispensável que a quantidade de semente produzida seja satisfatória.

Trifolium resupinatum L., na sua forma espontânea, quer na ssp. *resupinatum* quer na ssp. *suaveolens*, é uma diploide com 2n = 16, não sendo a ssp. *resupinatum* de grande interesse forraginoso, mercê do seu porte difuso e do fraco desenvolvimento vegetativo. As formas em cultura e que serviram de base ao nosso trabalho filiam-se na ssp. *suaveolens;* são igualmente diploides, mas de grande valor forraginoso e foram seleccionadas no Departamento de Forragens da Estação Agronómica Nacional (Marques de Almeida, 1943).

Como se conhecem outras espécies selvagens de *Trifolium* com elevado grau de poliploidia (14 a 20-ploides), sem que este

facto afecte a sua viabilidade (LEVAN, 1942), era de admitir a hipótese de que o complexo cromosómico da forma diploide de *T. resupinatum* ssp. *suaveolens* (n = 8) não constituísse o arranjo óptimo para o qual o seu desenvolvimento vegetativo seria máximo e de cuja duplicação resultassem formas inviáveis.

As formas autotetraploides por nós obtidas pela acção da colquicina sobre os meristemas caulinares apresentavam algumas irregularidades meióticas na divisão I mas os seus efeitos tornavam-se pouco perceptíveis no final da divisão II.

A existência de polivalentes na profase das formas tetraploides deste trevo e de alguns univalentes que por via de regra se dividiam na divisão II, comportando-se normalmente, mas que algumas vezes se dividiam na divisão heterotípica e então originavam retardatários que eram ou não encorporados nos núcleos telofásicos, originando raramente micronúcleos, pouco interferiam no decurso normal da divisão II. Com efeito, na divisão homotípica, as irregularidades eram pouco frequentes; nos casos em que era possível contar os elementos existentes em cada placa metafásica quase sempre se viam 16 cromosomas e em ana-telofase era possível distinguir 4 grupos de 16 cromosomas. O aspecto normal da divisão homotípica deve-se à elevada percentagem de bivalentes, à frequência de tetravalentes em anel e ao facto de os univalentes se dividirem, por via de regra, na II divisão. A gametogénese tem, consequentemente, aspecto normal e dela resulta elevada percentagem (80-90 %) de micrósporos perfeitos.

Se admitirmos que no decurso da formação dos óvulos se passam as mesmas irregularidades meióticas, teríamos uma redução da percentagem de óvulos normais de cerca de 20 a 10 %.

Assinalamos também que as poucas irregularidades meióticas registadas se têm vindo a atenuar de geração em geração. A gradual diminuição de irregularidades parece devida a algum mecanismo por meio do qual os quadrivalentes e trivalentes são substituídos por bivalentes, facto que virá a reflectir-se, como é óbvio, na diminuição da esterilidade das formas 4n e, consequentemente, no aumento gradual da produção de semente.

A fertilidade está dependente do equilíbrio génico existente no complexo cromosómico e a duplicação de um complexo cromosómico, provocando perturbações meióticas, altera aquele equilíbrio afectando a gametogénese, a fecundação e o desenvolvimento do embrião, logo, reduzindo a fertilidade.

Para determinadas espécies o melhor arranjo génico encontra-se nas formas diploides. Neste caso o seu desenvolvimento vegetativo, assim como a fertilidade, é máximo e qualquer alteração no complexo cromosómico afectará o vigor e a fertilidade. Noutras espécies, porém, ou porque o arranjo génico não seja o óptimo ou porque em consequência de duplicações do complexo cromosómico se dêem novos rearranjos, é possível obter formas poliploides mais vigorosas e mais férteis do que as diploides que lhes deram origem. Há que fazer apenas trabalho de selecção e fixar as melhores.

Ficou bem evidente, pelos resultados comparativos expostos, que o complexo cromosómico das formas diploides de *T. resupinatum* ssp. *suaveolens* não constitue o equilíbrio óptimo da espécie e que a duplicação da sua constituição cromosómica teve, como consequência, para as formas tetraploides, um maior desenvolvimento vegetativo, embora com ligeira quebra na fertilidade. Com efeito, as plantas tetraploides por nós obtidas apresentavam, em relação às diploides, uma vegetação mais exuberante, os caules mais túrgidos, maiores folhas e em maior número, bom afilhamento, em suma, toda a parte aérea mais carnuda e de um verde mais intenso. Estas características têm-se mantido, em cultura ao ar livre. Resultados semelhantes obteve Levan (1942) em formas autotetraploides de *T. pratense* (2 x), *T. hybridum* (2 x) e ainda em *T. repens* (4 x).

As plantas tetraploides de *T. resupinatum* ssp. *suaveolens* comportaram-se, em estufa, como tendo um ciclo vegetativo mais longo do que as diploides. As sementes tetraploides têm não só maior volume (Est. III, Fig. 2) como ainda peso sensivelmente duplo do das sementes diploides (confrontar o Quadro II), característica que representa uma grande vantagem do ponto de vista de reservas germinativas, sobretudo em meios e climas adversos.

Não obstante uma evidente melhoria na produção de massa verde em formas autotetraploides de trevos (Levan, 1942; Levan & Müntzing, (1952; Eigsti & Dustin, 1955), a diminuição de fertilidade, verificada por todos os autores nos primeiros anos de vida destas formas tetraploides, seria uma causa inibitória do seu aproveitamento como forragens se não se atenuasse, como acontece, nas gerações seguintes.

De facto, apesar de nas primeiras gerações se terem verificado quebras de fertilidade da ordem dos 25 % (Levan, 1942), esta

diminuição de produção de semente resultante da poliploidização à custa da colquicina foi-se atenuando em gerações seguintes a tal ponto que, em algumas espécies (*T. pratense*, por exemplo), as formas tetraploides acabam por ser tão férteis como as diploides de que provieram e com um aumento na produção de massa verde que chega a atingir 30 a 40 % (Levan & Müntzing, 1952).

As formas tetraploides por nós obtidas beneficiaram, desde início, de um maior vigor vegetativo; quanto a fertilidade, embora variável de linha para linha, como se infere do Quadro III, não há dúvida de que a podemos considerar satisfatória. Com efeito, enquanto a fertilidade nos diploides tem um valor de 79,5 %, em cerca de metade das linhas tetraploides a fertilidade é superior a 60 % e apenas em três linhas se mostrou inferior a 50 %.

As irregularidades meióticas, verificadas no decurso da formação dos gametas masculinos (Estampas I e II) e admitidas na formação dos óvulos, permitiam admitir uma redução de cerca de 20 % nos zigotos viáveis; não justificam, porém, a fertilidade encontrada nas diversas linhas pois não só o pólen produzido é em quantidade mais que suficiente, como ainda o facto de existirem dois óvulos por vagem permitia uma maior quantidade de sementes por capítulo e portanto uma maior fertilidade. Uma vez que as irregularidades meióticas, só por si, não justificam tão baixa fertilidade e dado que se não encontram formas aneuploides, temos que admitir a existência de factores genéticos responsáveis pelo aborto de gametas ou de zigotos de constituição normal.

A fertilidade dos tetraploides, estando compreendida entre 43,8 e 69 % no terceiro ano de vida das plantas, pode considerar-se, no entanto, perfeitamente satisfatória. De facto, se atendermos ao elevado número de capítulos por planta, a quantidade de sementes que a cada uma cabe traduz-se já num número suficientemente grande. E se considerarmos que, de ano para ano, se vão naturalmente eliminando as causas que impedem maior fertilidade, à semelhança do que acontece em *T. pratense* e de acordo com as nossas observações, é de esperar que os valores das percentagens de fertilidade aumentem e, consequentemente, a produção de semente por planta aumente também.

A selecção natural e artificial que se seguirá no decurso deste trabalho eliminará as formas portadoras de caracteres indesejáveis, tais como deficiente fertilidade e inferior produção de massa forraginosa, onde as houver.

Não obstante a alogamia da citada subspécie de *T. resupinatum* e de se encontrarem formas diploides testemunhas ao lado de formas tetraploides, não encontrámos uma única plântula triploide.

A inviabilidade de embriões triploides, a verificar-se, seria da maior importância para a fixação e a estabilidade das formas autotetraploides. Ajudaria ainda a explicar a diminuição de fertilidade encontrada.

Também não apareceram plantas aneuploides, o que leva a concluir que os zigotos de constituição anormal são inviáveis.

Ensaios de autofecundação das formas tetraploides não deram lugar a uma única semente.

Pelo que respeita ao benefício, do ponto de vista forraginoso, obtido com as formas autotetraploides de *T. resupinatum* L. ssp. *suaveolens*, pouco podemos ainda dizer pois, como tivemos ocasião de frizar, as nossas observações referem-se a plantas desenvolvidas em estufa. Neste quarto ano de vida, porém, as sementeiras foram já feitas no campo, apresentando as diversas linhas muito bom aspecto vegetativo, impressão que se pode colher observando as fotografias 1 e 2 (Est. IV) de um talhão com plantas de uma linha da C_4. Estes trevos tetraploides mostraram ser dotados de boa e rápida rebentação ao corte, verificando-se, além disso, que os cortes não afectaram o vigor inicial.

Algumas referências bibliográficas que encontrámos sobre o valor forraginoso de trevos autotetraploides são encorajadoras, pois que têm sido criadas diversas cultivares comerciais tetraploides, superiores às formas diploides originais, não só em *T. pratense* como em *T. hybridum* (Eigsti & Dustin, 1955).

A obtenção de formas tetraploides de *T. resupinatum* ssp. *suaveolens* dotadas de maior vigor e desenvolvimento vegetativo do que as diploides originais e portadoras das características de fertilidade referidas constituirá, assim o admitimos, um passo em frente no melhoramento de plantas, como esta, de tão grande utilidade para o nosso País.

AGRADECIMENTO

Queremos deixar expressos os nossos melhores agradecimentos à preparadora S.ª D. Cândida Costa Rodrigues, pessoa de invulgar habilidade técnica, pela ajuda que nos deu na realização deste rabalho.

SUMMARY

AUTOTETRAPLOID CLOVERS

I. *Trifolium resupinatum* L. ssp. *suaveolens* (Willd.) Dinsm.

Reference is made to some morphologic, physiologic and cytologic consequences of polyploidy induction owing to the colchicine action on strains of *T. resupinatum* L. ssp. *suaveolens* (Willd.) Dinsm. from the forage collection of the «Estação Agronómica Nacional».

The most outstanding morphologic changes are: a greater growth of stems, leaves, nflorescences and seeds. Attention is called to its greater turgescence of foliage mass, the greater vegetative vigour of tetraploid plants and also their longer vegetative period. The seeds of 4n plants are about double the weight and volume of the 2n ones, which is a great advantage from the point of view of germination reserves.

Some irregularities were found in the prophase I namely agglutination, and formation of univalents, trivalents and tetravalents.

In some anaphases I the cytological consequences of these multivalents were found out by the typical assynchronism in the chromosome movement towards the poles as well as by the presence of lagging chromosomes, chromatic bridges and micronuclei.

Second division was found to run through in a more regular way ending many times by a practically normal telophase.

As a matter of fact there is a high percentage of normal pollen, from 80 to 90 per cent, in the various strains.

The fertility rate of tetraploids varies from 43,8 to 69 per cent. An explanation of this deviation is attempted. The quantity of seed produced is already economically sufficient.

The germination power of the seeds, which varies from strain to strain, lies from 75 to 100 per cent.

A strain of C_4 in an experimental test spronted well after cutting with rapid regeneration. It was also noticed that cutting did not affect the earlier vigour of the plants.

BIBLIOGRAFIA

Almeida, J. Marques de

1943 Trevo da Pérsia, uma nova forragem. *Rev. Agron.* **31**: 383-395.

Blakeslee, A. F. & Avery, A. G.

1937 Methods of inducing chromosome doubling in plants. *Jour. Hered.* **28**: 393-411.

EIGSTI, O. J. & DUSTIN Jr., P.
1955 *Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry*. Ames, Iowa. U. S. A.
FLOVIK, K.
1940 Chromosome numbers and polyploidy within the flora of Spitsbergen. *Hereditas*, **26**: 430-440.
HAGERUP, O.
1928 Morphological and cytological studies of Bicornes. *Dansk Bot. Arkiv*, **6** (1): 1-27.
1932 Über Polyploidie in Beziehung zu Klima, Ökologie und Phylogenie. *Hereditas*, **16**: 19-40.
JULEN, G.
1949 Clover and timothy breeding; breeding of red and Alsike clover. *Hereditas Suppl.* 44-45.
KARPETSCHENKO, G. D.
1925 Karyologische Studien über die Gattung *Trifolium* L. *Bull. appl. Bot. Genet. Plant Breed.* **14**: 143.
LEVAN, A.
1942 Plant breeding by induction of polyploidy and some results in clover. *Hereditas*, **28**: 245-246.
———— & MÜNTZING, A.
1952 Comments on Professor Glushchenko's «Correction of a correction». *Hereditas*, **38**: 377-384.
LÖVE, A. & LÖVE, D.
1942 Chromosome numbers of Scandinavian plant species. *Bot. Not.*, **1942** 19-59.
1943 The significance of differences in distribution of diploids and polyploids. *Hereditas*, **29**: 145-163.
1949 The geobotanical significance of polyploidy. I. Polyploidy and latitude. *Portug. Acta Biol.* (A) Vol. **R. B. Goldschmidt**: 273-352.
1956 Cytotaxonomical conspectus of the Icelandic flora. *Acta Horti Gotoburgensis* **20**: 65-291.
MÜNTZING, A.
1936 The evolutionary significance of autopolypoidy. *Hereditas*, **21**: 263-378.
RODRIGUES, J. E. DE MESQUITA
1953 *Contribuição para o conhecimento cariológico das halófitas e psamófitas litorois*. Dissertação para Doutoramento. Coimbra Editora, L.da, Coimbra.
SENN, H. A.
1938 Chromosome number relationships in the *Leguminosae, Bibl. Genet.* **12**: 175-336.
STEBBINS Jr., G. L.
1950 *Variation and evolution in plants*. Columbia Univ. Press, New York.

LEGENDA DAS ESTAMPAS

Estampa I

Fig. 1 e 2 — Placas metafásicas em células de meristemas caulinares: 1) de um trevo tetraploide ($4n = 32$); 2) de um trevo octoploide ($8n = 64$).
Fig. 3 — Final de diplotena mostrando 8_{IV}.
Fig. 4 — Diacinese com 8_{IV} dispersos pela periferia do núcleo.
Fig. 5 — Diacinese com $5_{IV} + 1_{III} + 4_{II} + 1_{I}$.
Fig. 6 — Prometafase com $3_{IV} + 10_{II}$.
Fig. 1 a 6: Carnoy-Orceina acética.

Estampa II

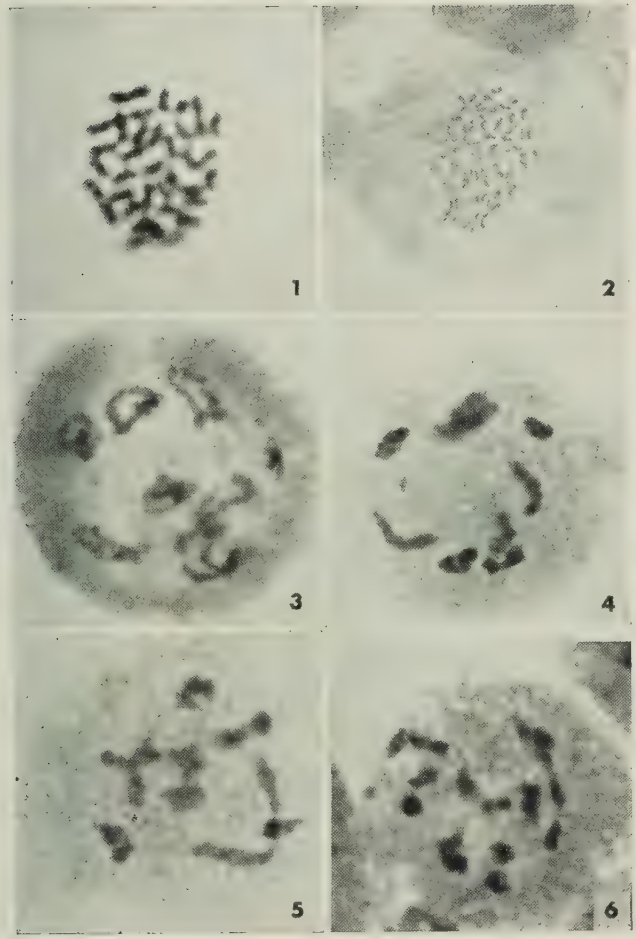
Fig. 1 — Metafase com $4_{IV} + 8_{II}$.
Fig. 2 — Anafase com 16_{II} em cada grupo anafásico.
Fig. 3 — Anafase com 1_{I} em divisão e 1_{I} indiviso; polo a S com 16 cromosomas e polo a N com 15.
Fig. 4 — Uma ponte anafásica com um fragmento e um retardatário.
Fig. 5 — Metafase II com 16_{II} em cada placa.
Fig. 6 — Final de anafase II vendo-se, em duas das quatro placas, 16 cromosomas.
Fig. 1 a 6: Carnoy-Orceina acética.

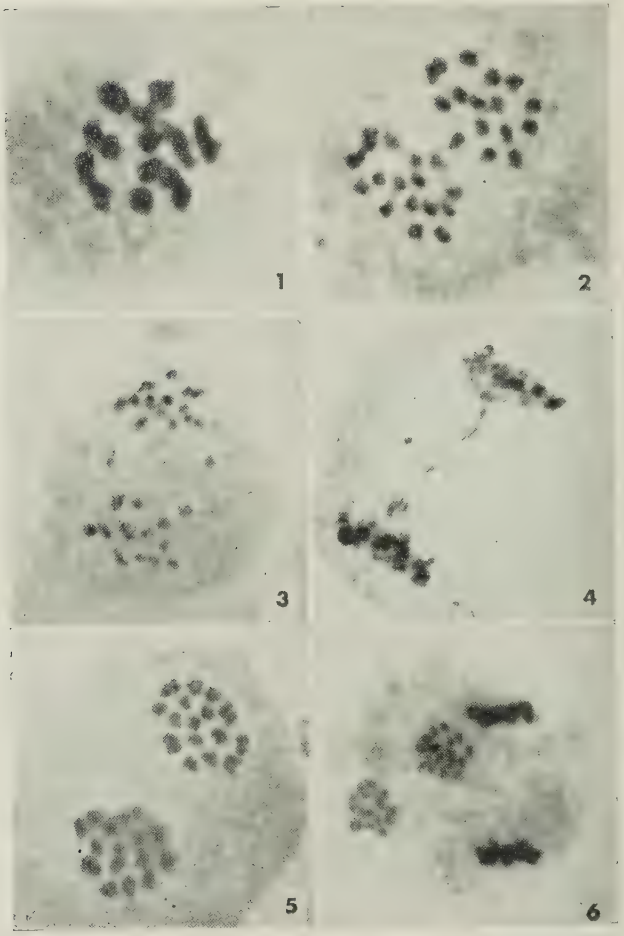
Estampa III

Fig. 1 — Folhas de trevo tetraploide e de trevo diploide. Repare-se nas diferenças de forma dos folíolos e no maior tamanho das folhas tetraploides.
Fig. 2 — Sementes de trevos diploides e de trevos tetraploides mostrando o maior volume das sementes tetraploides. Explicações no texto.

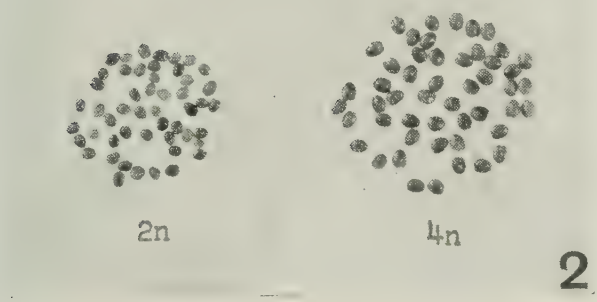
Estampa IV

Fig. 1 — Aspecto geral de um talhão de trevo submetido a cortes.
Fig. 2 — Um pormenor do mesmo talhão.


1
2
3
4
5
6


1
2
3
4
5
6

4n
2n
1


2n
4n
2

1
2

JUVENILIDADE NA *OLEA EUROPAEA* L.

POR *J. VIEIRA NATIVIDADE*
(Estação Agronómica Nacional)

O regresso à juventude, estranha discrepância no ciclo fatal da vida, constitui um curioso e complexo fenómeno na ontogénese de muitas espécies lenhosas. Esta «reversão», como lhe chamou GOEBEL (1900), e graças à qual «muitas plantas adultas podem regressar à fase juvenil do seu desenvolvimento», tem dado modernamente origem a apaixonadas discussões e reveste-se de enorme interesse do ponto de vista prático.

As observações que tivemos ocasião de realizar na oliveira mostram que esta espécie, pelas características morfológicas e pela duração da fase juvenil, e ainda pela forma como reage à indução artificial do juvenescimento, constitui material sobremaneira favorável para o estudo do fenómeno. De facto, mostra-se ser possível, nesta espécie, dissociar, digamos, o crescimento do desenvolvimento e manter a fase juvenil por um período pràticamente ilimitado, o que vem abrir possibilidades novas ao estudo da fisiologia de um processo que está ligado a problemas básicos da biologia vegetal.

Sem a pretensão de revermos a já extensa bibliografia sobre a juvenilidade, afigura-se-nos útil uma breve referência às mais importantes investigações até agora realizadas, o que permitirá apreciar a posição actual do problema.

A JUVENILIDADE NAS ESPÉCIES LENHOSAS

Foram os botânicos da segunda metade do século passado que chamaram a atenção para o facto de, tanto a forma como o tamanho e outras características das folhas, e até por vezes o tipo de filotaxia, apresentarem, nas plantas novas de semente, progres-

sivas modificações a partir da base do caule, modificações estas correspondentes a fases ou estádios diferentes da sua ontogenia.

Este polimorfismo foliar, acentuadíssimo nalgumas espécies lenhosas, foi então considerado um fenómeno de atavismo. Os diversos tipos de folhas, originados a partir das cotilédones, representariam os estádios por que esses órgãos passaram no decurso da evolução da espécie através dos tempos (Ettingshausen & Krasan, 1888, Noé, 1894, Knowlton, 1898, citados por Oliver, 1939), doutrina esta mais modernamente perfilhada, entre outros, por Jeffrey (1930), Oliver (1939) e por Michurin (1949). Designou-se o fenómeno por *polimorfismo ancestral* e as folhas atípicas foram consideradas folhas *atávicas*. O processo seria irreversível e só se manifestaria nas plantas propagadas por via sexuada.

Circunscrita, durante muito tempo, ao âmbito de simples curiosidade morfogénica, este tipo de heterofilia começou a interessar, e, podemos dizer, a alarmar até os taxonomistas, depois que Kock, em 1852, verificou que uma estaca de *Thuya occidentalis* havia dado origem a uma planta que, pelas características da sua morfologia externa, era forçoso incluir, nada menos, do que num género botânico diferente: o género *Retinospora*. Pouco depois, Carrière (1867) observou que neste mesmo género haveria que incluir uma variedade de *Chamaecyparis thyoides*, produto da segregação desta espécie.

Mostrou-se, assim, que a fase juvenil de algumas Coníferas, além de ocorrer também em plantas propagadas vegetativamente, podia ser tão prolongada e de tal modo diferente da fase adulta que levava a distribuir por agrupamentos taxonómicos diferentes plantas da mesma espécie em fases distintas do seu desenvolvimento. Beyerink (1890) observou, por sua vez, em plantas novas do género *Cupressus*, que certas influências externas adversas ao crescimento podiam provocar a formação de ramos do tipo juvenil. Foi esta, sem dúvida, a primeira verificação da reversibilidade nas fases de desenvolvimento das plantas lenhosas.

As extensas investigações de Beissner durante o último quartel do século passado muito contribuiram para o esclarecimento do fenómeno da juvenilidade nas Cupressíneas, especialmente nos aspectos que interessam a taxonomia. E em face da longa duração, por vezes, da fase juvenil, admitiu este autor a possibilidade de tal fase poder ser fixada através de prolongada propagação por via vegetativa, ponto de vista este ainda hoje perfilhado por alguns

investigadores, mas sem que se apoie, como veremos, na necessária evidência experimental.

Foi, no entanto, GOEBEL (1900) quem pela primeira vez observou, em certas Coníferas, que os ramos formados na parte inferior do tronco, próximo do solo, apresentavam as mesmas características de juvenilidade das plantas novas de semente, e atribuiu esta «reversão», no sentido ontogénico, ao facto de essa zona do caule conservar, possivelmente durante toda a vida da planta, a condição juvenil.

Mais do que a teoria da «reversão», formulada por este autor, o que logo se revelou de incontestável interesse foi a verificação de que os ramos desse tipo enraizavam fàcilmente, o contrário do que acontece nos ramos na fase adulta. Embora a capacidade dos rebentos da base do tronco para emitirem raízes, sobretudo quando favorecida pelo estiolamento, fosse utilizada desde a mais alta antiguidade na multiplicação de algumas espécies lenhosas, a verdade é que até então essa facilidade de enraizamento não havia sido relacionada com o fenómeno da juvenilidade. A descoberta de GOEBEL contribuiu, assim, para esclarecer o problema da propagação vegetativa de muitas plantas consideradas de enraizamento difícil ou impossível.

Apesar disso, só cerca de trinta anos depois, e graças ao incremento que tomaram os estudos sobre regeneração e propagação assexuada em pomologia e em silvicultura, a juvenilidade começou, de novo, a ser objecto de estudos metódicos. GARDNER (1929) verifica que as estacas provenientes de maceiras de semente com um ano de idade eram capazes de emitir raízes, e que esta aptidão se reduzia muito, ou de todo desaparecia, nas plantas com dois ou mais anos. Numerosas outras espécies lenhosas ensaiadas por este autor reagiram de forma análoga. Confirmando as observações de GOEBEL nas Cupressíneas, GARDNER observou ainda, na maceira, que após o atarraque do tronco ao nível do solo, os ramos novos aí formados possuiam o mesmo poder de radicação das plantas novas de semente.

Torna-se impossível rever aqui toda a extensa bibliografia publicada sobre a matéria nos últimos vinte anos, e graças à qual se ficaram a conhecer melhor as expressões morfológicas da juvenilidade em numerosas espécies arbóreas e se confirmou a excepcional aptidão para o enraizamento das estacas provenientes de ramos na fase juvenil. Depois de GARDNER (1929), a juvenilidade

na maceira e ainda noutras fruteiras, em especial no ponto de vista da propagação vegetativa, foi estudada por STOUTEMYER, MANEY & PICKETT (1935, 1936), por PASSECKER (1940, 1944, 1947, 1952), por KEMMER (1947, 1950, 1950 a, 1953), por FRITZSCHE (1948), por KEMMER & THIELE (1954) e por BLAIR, MAC ARTHUR & NELSON (1956). Para o conhecimento do mesmo fenómeno em *Citrus* contribuiram as investigações de FROST (1938), e neste género, e ainda na anoneira, no abacateiro e na papaieira, as de BIALE & HALMA, (1938), na *Hevea* as de DIJKMAN (1951) e FERWERDA (1952), e na oliveira as nossas contribuições (NATIVIDADE, 1943, NATIVIDADE & S. COELHO, 1946). Entre os estudos relacionados com as espécies florestais, recordaremos os de DORAN, HOLDSWORTH & RHODES (1940), em *Pinus*; de GRACE (1939) em *Picea* e *Abies*; de THIMANN & DE LISLE (1939) nos géneros *Pinus*, *Picea*, *Acer* e *Quercus*, de STOUTEMYER, O'ROURKE & STEINER (1944) em *Gleditsia triacanthos*; de MUCKADELL (1954) em *Fagus sylvatica* e de MIYAJIMA (1951) em *Chamaecyparis*.

Apesar de estas e de outras contribuições para o estudo da juvenilidade das espécies arbóreas, escassos são ainda os elementos de que se dispõe para o completo esclarecimento do fenómeno, cujo interesse, tanto do ponto de vista morfológico e morfogénico, como do ponto de vista da aplicação prática imediata, é incontestável.

De facto, e independentemente dos aspectos relacionados com a propagação vegetativa, a provar-se que a fase juvenil, considerada estéril, pode ser, se não já perpetuada, pelo menos prolongada por operações da técnica cultural ou por se utilizarem, na propagação, ramos do tipo juvenil, a economia da cultura pode ser apreciàvelmente afectada. Por outro lado, a possibilidade de se vir a encurtar o período juvenil, que nalgumas espécies é muito prolongado, tem enorme importância, tanto nos trabalhos de melhoramento genético, como no simples aspecto cultural.

Forçoso é reconhecer, todavia, que as conclusões sobre o o comportamento da juvenilidade, especialmente no que diz respeito à duração desta fase, suas relações com a esterilidade e quanto à indução artificial do seu encurtamento ou prolongamento, são de tal modo discordantes que, longe de esclarecerem, mais obscurecem o fenómeno. Tais discordâncias explicam-se, em grande parte, a nosso ver, pelo diverso comportamento das espécies estudadas e talvez por uma apressada generalização das conclusões quando mal se conhece ainda a fisiologia do processo.

PASSECKER, cujos trabalhos atrás se referiram, compara as fases

do desenvolvimento das plantas — fase juvenil, fase de transição e fase adulta — a metamorfoses análogas àquelas por que passam os animais, embora, no caso das plantas, só afectem o novo crescimento e não a totalidade do indivíduo. Segundo este autor, a transição da fase juvenil para a adulta é genèticamente determinada, mas pode ser influenciada por factores do ambiente. De acordo com GOEBEL (1900), a fase juvenil subsistiria durante toda a vida da árvore na base do tronco e nas regiões mais próximas desta. FRITZSCHE (1948) observou, por sua vez, em apoio da teoria das fases de desenvolvimento de PASSECKER, que, nas pereiras e maceiras, a fase juvenil difere da fase adulta nas características do crescimento, na anatomia do lenho e na composição química deste, e é levado a concluir que a fase juvenil não possa ser artificialmente encurtada.

Nos numerosos trabalhos já citados, contesta KEMMER muitas das afirmações de PASSECKER e de FRITZSCHE, algumas das quais, principalmente no que respeita à esterilidade da fase juvenil, localização da zona de juvenilidade e fixação irreversível da fase adulta estão também em desacordo com as nossas anteriores observações na oliveira (NATIVIDADE, 1943).

Não tem interesse determo-nos nos pormenores desta polémica entre os investigadores alemães, e que se arrasta há muitos anos já. Mas, não queremos deixar passar sem referência a doutrina recente de PASSECKER (1952) sobre a degenerescência dos velhos *clones* e possibilidade do seu rejuvenescimento pela utilização, na enxertia, de ramos da base do tronco, dotados do carácter juvenil. Aí se patenteiam os perigos da precipitada generalização de conclusões não apoiadas na evidência experimental.

A degenerescência dos *clones* por simples senescência, como este autor e outros investigadores sugerem, não teve até hoje confirmação. No caso da oliveira, por exemplo, tudo indica que muitas das nossas variedades culturais de hoje foram introduzidas pelos romanos na Península, e a propagação vegetativa no decurso dos séculos não afectou nem o seu vigor, nem a sua produtividade.

As modificações observadas dentro das linhas vegetativas de algumas espécies, ou são devidas ao ataque de virus, ou a mutações desfavoráveis acidentalmente propagadas, e nestas condições não podem ser combatidas por qualquer rejuvenescimento artificialmente induzido. E é deveras para estranhar que nenhuma destas causas

normais de degenerescência haja sido tomada em consideração pelos autores a que nos referimos.

De imediato interesse para o nosso estudo são as questões relacionadas com a duração da fase juvenil, e é a esta que nos desejamos especialmente referir.

Varia muito, neste aspecto, o comportamento das espécies estudadas. Nas maceiras, por exemplo, as fases juvenil e de transição são muito curtas e observáveis apenas no crescimento do primeiro ano; pelo contrário, em certas Coníferas, nalguns eucaliptos, na oliveira, no sobreiro, na *Fagus sylvatica* e até em *Pyrus communis* a fase juvenil perdura vários anos. A expressão morfológica desta fase de desenvolvimento é, nalgumas espécies, pouco nítida, enquanto que noutras diverge consideràvelmente da fase adulta.

Embora já Beissner, a cuja contribuição para o esclarecimento do fenómeno da juvenilidade tivemos ocasião de nos referir, houvesse admitido, há mais de meio século, a possibilidade de perpetuar ou fixar a fase juvenil pelo recurso à propagação vegetativa, a verdade é que, até hoje, um único caso apenas de fixação dessa fase é referido na literatura, e esse caso está longe de ser convincente.

Em *Fagus sylvatica*, onde a fase juvenil é caracterizada pela persistência das folhas, Muckadell (1954) verificou que os ramos de tipo juvenil, quando enxertados em plantas adultas, conservam as características de juvenilidade durante um longo período e são estéreis. No entanto, o caso de fixação apresentado pelo autor (pág. 790, fig. 3) diz respeito a plantas obtidas de semente, cultivadas em sebe, onde os cortes periódicos prolongam a fase juvenil, e não pode ser aceita como traduzindo uma verdadeira fixação.

O que parece verificar-se, de facto, é que o emprego, na enxertia, de ramos na fase juvenil não modifica as características de juvenilidade e, nalguns casos, pode contribuir para prolongar esta fase. Na *Gleditsia triacanthos*, onde a juvenilidade está associada à presença de espinhos, Stoutemyer, O' Rourke & Steiner (1944) verificaram que tal característica se mantém nos enxertos, o que levou estes autores a admitir a possibilidade do estabelecimento, a partir daí, de *clones* espinescentes. Também nas laranjeiras a espinescência dos ramos, própria da fase juvenil, subsiste durante algum tempo quando se utilizam na enxertia ramos desse tipo (Frost, 1938). Este facto é ainda confirmado pelas observações de Oldén (1952) em maceiras, de Blair, MacArtur & Nelson (1956) em pereiras de semente e de Ferwerda (1952) em *Hevea*.

Nenhuma referência se faz, nos estudos a que nos referimos, à influência que, no caso da enxertia, um ramo juvenil possa exercer sobre o porta-enxerto na fase adulta. No entanto, em *Hedera Helix*, DOORENBOS (1954) obteve resultados na realidade imprevistos: quando se enxertam ramos do tipo juvenil em porta-enxertos na fase adulta, estes perdem a capacidade de florescer e o novo crescimento apresenta características de juvenilidade em vários graus; na enxertia inversa, adulto sobre juvenil, opera-se análogo rejuvenescimento no ramo adulto enxertado. Estes resultados estão, porém, em desacordo com os obtidos por HIEMELEERS (1953), em maceiras.

Completaremos esta rápida resenha com as nossas observações na oliveira, iniciadas anos atrás (v. NATIVIDADE, 1943).

A propagação por estaca, com ramos na fase juvenil formados na base do tronco de árvores adultas, estas também de origem vegetativa (*clones* culturais), não contribui para o prolongamento daquela fase. Normalmente, logo no fim do primeiro ciclo vegetativo, ou no ano imediato, as folhas terminais dos lançamentos apresentam todas as características da fase adulta. O mesmo se verifica nos rebentos que continuam a vegetar sobre a planta que lhes deu origem, e qualquer que seja o nível do tronco em que se formem.

É já, porém, diverso o comportamento das plantas de semente, o que também se verifica noutras espécies lenhosas, e nesta anomalia reside um dos mais intricados aspectos do problema da juvenilidade. As manifestações morfológicas dessa fase são aqui muito mais acentuadas e duradoiras. Nas árvores adultas, obtidas também de semente, os ramos de origem adventícia formados no tronco, e sobretudo os que se encontram mais próximos da base, conservam a fisionomia juvenil durante muito tempo, em contraste com os ramos superiores da copa com folhagem do tipo adulto. As nossas observações incidiram em plantas de semente, algumas delas com mais de 50 anos, já portanto muito longe da juventude, o que torna mais difícil ainda a explicação do seu comportamento.

A decapitação, a 0,60-1 m, a contar do solo, de oliveiras de semente com cerca de 20 anos, determina a regressão total do novo crescimento à fase juvenil, e esta fase, nos nossos ensaios, continua a manter-se há mais de seis anos. Quando se utilizam, na propagação por estaca, rebentos juvenis de plantas de semente, estes comportam-se como os ramos provenientes de *clones* culturais, sem apreciável prolongamento do período juvenil.

Se exceptuarmos o caso da *Fagus sylvatica*, que aliás reclama confirmação, verifica-se que, até agora, apenas foi possível, pelo recurso à propagação vegetativa, transplantar, digamos, a fase juvenil, mas sem que essa transplantação envolva modificações apreciáveis no comportamento ulterior das plantas assim obtidas. As divergências nos resultados que a literatura nos patenteia podem atribuir-se à diversa natureza do material utilizado, pois nalgumas espécies, como se referiu, a fase juvenil é curta e pouco aparente, enquanto que noutras é prolongada e manifesta-se por intensa heterofilia.

Em nenhuma espécie lenhosa se verificou até agora ser possível manter a planta no estado juvenil durante um período pràticamente ilimitado. A indução e a manutenção artificial da juvenilidade na oliveira, de que nos vamos ocupar, apresenta por isso grande interesse.

JUVENILIDADE E NANISMO NA *OLEA EUROPAEA*

Na vertente ocidental da grande serrania jurássica dos Candieiros, numa paisagem esquelética em que avultam as grandes bancadas calcárias, depara-se-nos amiúde, a par da vegetação rasteira e esclerófila, degradada pelo intenso pastoreio, uma planta estranha, moldada às fragas como um enorme líquene. Planta anã, disforme, ramos caprichosamente emaranhados em que parecem alteradas todas as leis de equilíbrio e de harmonia do mundo vegetal — dir-se-ia estarmos em presença de uma miniatura de árvore, de um aborto saído das mãos pacientes e inquisitoriais de um jardineiro japonês.

São oliveiras espontâneas, nascidas entre as fendas da rocha, e cuja ramagem sofre mutilação incessante pelo gado caprino e ovino. A vegetação deste tipo tufoso e rasteiro constitui ocorrência frequente nas serranias e nas charnecas mediterrâneas, como consequência da pressão do pastoreio. As reacções, porém, da oliveira às mutilações da ramagem revestem-se de características particulares que muito interessa analisar.

Contagens efectuadas, não sem dificuldade, em cortes transversais na região do colo, revelaram que algumas destas plantas, a que melhor caberia a designação de Quasímodos vegetais, contam mais de meio século de existência e, apesar da sua minúscula estatura, apresentam-se nas melhores condições de sanidade e de

vigor. Nas plantas de maiores dimensões, o volume total da copa raro atinge cinco a seis decímetros cúbicos (Est. III e IV).

A desponta sistemática dos ramos pelos gados determinou o ananismo e um tipo de ramificação diferente do que é normal na espécie. O desenvolvimento da parte aérea sobre a rocha faz que a copa, espalmada, apresente duas faces: a superior, revestida de densa folhagem, e a inferior constituída pelo emaranhado dos ramos. (Est. V).

Só a simples possibilidade de sobrevivência destas formas anãs durante tão longo período constitui fenómeno estranho. De nenhum caso temos notícia, referido na literatura, em que pela desponta sistemática seja possível manter na estatura de pigmeu, por um lapso de tempo superior a meio século, sem graves perturbações fisiológicas e perda de vitalidade, uma árvore tão longeva e de tão grande arborescência.

Mas, a particularidade mais estranha ainda é o facto de tais plantas apresentarem todas as características morfológicas da fase juvenil, e se revelarem como que insensíveis ao decorrer implacável do tempo. Plantas na verdade estranhas, morfològicamente sem idade e para as quais não existe, portanto, adolescência, maturidade, velhice, seres foragidos, a bem dizer, às leis inflexíveis da vida.

As folhas são pequenas — 4-12 mm de comprimento — umas elípticas, outras ovadas, ou arredondadas, outras ainda obovadas, com a base do limbo arredondada e o vértice arredondado e mucronado. O pecíolo é por vezes tão curto que as folhas juvenis se podem considerar sub-sésseis (Est. I e II). Em virtude da muito menor densidade do indumento na página inferior do limbo, esta apresenta cor verde, em oposição à cor cinzenta-prateada das folhas do tipo adulto. Ramos novos glabros ou glabrescentes. Nas ramificações laterais, muito curtas e com reduzidos entre-nós, as folhas da extremidade tomam frequentemente a disposição de roseta (Est. II-B).

Todas estas características são próprias da fase juvenil das oliveiras de semente, ainda quando não hajam sofrido qualquer mutilação na ramagem. Pode dizer-se até que, nas oliveiras anãs, as manifestações de juvenilidade se apresentam muito mais acentuadas.

As particularidades de ramificação atrás referidas, e que tanto contribuem para o estranho aspecto destas plantas, explicam-se pela destruição, pelos gados, da parte terminal dos lançamentos anualmente produzidos, o que provoca o desenvolvimento dos gomos laterais. Os ramos aí formados sofrem por sua vez a des-

ponta, que obriga a nova ramificação e, quando esses gomos se não desenvolvem, os eixos secam e assemelham-se a espinhos, os quais até certo ponto defendem a planta de mais intensa depredação.

As ramificações do pequeno tronco são curtas e grossas, com o aspecto de velhos esporões ramificados das Pomóideas, protegidas por um invólucro suberoso de cor cinzenta-amarelada, com lentículas proeminentes, o qual substitui a primitiva epiderme, sem formação de ritidoma típico. A periderme é de origem epidérmica, contínua, e a feloderme apresenta abundantes cloroplastídeos.

Como é de prever, em face das dimensões que as plantas apresentam ao fim de quatro ou cinco décadas, o crescimento médio anual do diâmetro do tronco e dos ramos mais grossos é muito reduzido, da ordem de 0,6 a 1 mm.

Nas oliveiras anãs, como se verifica na fase juvenil de outros xerófitos, as especializações estruturais xerofíticas apresentam-se muito atenuadas, ainda quando tudo parece favorecer o reforçamento daquelas especializações. As plantas vivem em estreitas fendas da rocha e aí sofrem intensa insolação e grande carência de água durante a quadra de estiagem. Este comportamento poderá atribuir-se à relativa desproporção que existe entre o volume das raízes e o da parte aérea. A ramagem, periòdicamente mutilada, tem menor consumo de água e encontra-se, portanto, em condições diferentes da das plantas que vegetam em ambiente normal.

Quando observámos pela primeira vez estas oliveiras, supusemos, dada a constância das características e por não serem perceptíveis as mutilações sofridas, estar em presença de verdadeiros ecotipos, ou ecoformas, cuja morfologia estranha traduzisse uma adaptação estrutural às condições particularmente rudes do ambiente serrano. Verificámos, porém, que logo que estas plantas são colocadas ao abrigo da depredação dos gados retomam o desenvolvimento normal, e com acentuado vigor. Os novos lançamentos apresentam folhas correspondentes à fase de transição e mais tarde folhas adultas típicas, com evolução análoga à das plantas de semente em condições de vegetação normais.

DISCUSSÃO

Não se procurou até agora relacionar a duração da fase juvenil com o xerofitismo e, no entanto, verifica-se serem as espécies lenhosas dotadas de maiores especializações xerofíticas

precisamente aquelas em que a fase juvenil tem maior duração, melhor é expressa na morfologia externa e também as que reagem mais prontamente à indução artificial da juvenilidade.

Seria prematuro procurar tirar daí conclusões definitivas; todavia, não se pode deixar de pôr em evidência quanto a relação raiz-copa parece interferir na ocorrência e na duração da fase juvenil. O maior desenvolvimento do sistema radicular em relação à parte aérea é característico da primeira fase da vida dos xerófitos, e a este período correspondem as manifestações mais típicas da juvenilidade. Por outro lado, todas as interferências externas que tendem a reduzir o volume da ramagem, sem que seja afectado, directa e imediatamente, o sistema radicular, provocam a regressão à fase juvenil. É-se levado a supor que, nos casos referidos, a relação raiz-copa seja responsável por condições de ordem nutritiva e hormonal particulares que interferem nos processos ontogénicos. Estender-se-ia assim aos domínios da morfogénese a hipótese de Resende (1954) sobre a acção reguladora específica do sistema radicular através da absorção de elementos «contributing to the synthesis of natural auxin, or to certain substances synthesized in the roots which act like auxins or anti-auxins, or that influence the synthesis or inactivation of these» (pag. 95-96).

Tudo indica, de facto, que a fase juvenil corresponda a um estado fisiológico particular em que intervêm tanto as condições nutritivas internas como os factores de crescimento. Se se trata, porém, de hormonas específicas, de simples concentração ou distribuição diferencial de auxinas, ou da acção de factores inibidores, ou ainda se estamos em presença de uma manifestação indirecta da acção das substâncias promotoras do crescimento, é impossível dizê-lo no estado actual dos conhecimentos. Sem mais amplas investigações que expliquem, em termos bio-químicos, a acção reguladora das fitohormonas no metabolismo, que nos deixem entrever o mecanismo básico da indução morfogénica e ainda o papel que realmente desempenham as substâncias inibidoras ou modificadoras do crescimento e todo o complexo mecanismo enzimático, o problema da juvenilidade não pode vir a ser cabalmente esclarecido.

O caso da oliveira não permite pôr de lado a teoria da regulação, ou comando, hormonal, não só no que se refere à juvenilidade, senão também à indução do nanismo. A desponta sistemática dos ramos, que envolve a supressão dos meristemas apicais e das

folhas novas onde as auxinas, ou as substâncias precursoras destas são produzidas, traduz-se em redução considerável do crescimento e prolonga a fase juvenil por obstar ao desenvolvimento no sentido ontogénico, ou seja às modificações morfológicas e fisiológicas que normalmente estão associadas à idade.

Que o crescimento fosse distinto do desenvolvimento, pelo menos nas plantas monocárpicas anuais, já era admitido por Lisenko (cit.de Whyte, 1939) na sua teoria do desenvolvimento fásico para permitir interpretar o fenómeno da vernalização. O crescimento pròpriamente dito consistiria em modificações no tamanho e no peso dos órgãos, ao passo que o desenvolvimento seria constituido por uma sequência de ajustamentos internos e de «fases biológicas» que culminariam com a reprodução. As experiências sobre fotoperiodismo mostram também ser possível modificar as correlações que normalmente existem entre os dois processos.

Embora se soubesse há muito que a poda intensa dos ramos contribuía, nalgumas espécies, para prolongar a fase juvenil e retardar, portanto, a frutificação, nenhum caso se conhecia, nas plantas lenhosas, de perfeita dissociação, digamos, do processo de crescimento do processo de desenvolvimento, e em que fosse possível modificar, ao arbítrio do experimentador, as suas correlações normais por tempo indefinido. A oliveira constitui, por isso, material particularmente favorável para o estudo da morfogénese e da ontogénese nas espécies arbóreas.

SUMÁRIO

Depois de uma breve referência à literatura sobre o fenómeno da juvenilidade nas espécies lenhosas, descrevem-se as observações realizadas na oliveira e que mostram ser possível, nesta espécie, induzir artificialmente a juvenilidade por um período pràticamente ilimitado e modificar, portanto, ao arbítrio do experimentador, as correlações que normalmente existem entre crescimento e desenvolvimento.

Refere-se o comportamento das oliveiras espontâneas nas serranias mediterrâneas sujeitas ao intenso pastoreio pelo gado caprino e ovino. A desponta sistemática dos ramos determina a condição anã e a subsistência do tipo juvenil de crescimento por um período, nos casos examinados, por vezes superior a meio século.

Descrevem-se as principais características do crescimento

juvenil na oliveira, apreciam-se as relações entre xerofitismo e juvenilidade nas espécies lenhosas e apresenta-se uma interpretação fisiológica para os fenómenos observados.

JUVENILITY AND DWARFISM IN *OLEA EUROPAEA* L.

SUMMARY

After a brief reference to the literature on juvenility in woody plants, the Author relates his observations on the Olive-tree. From these observations it is possible to conclude that a state of practically unlimited juvenility can be experimentally induced in this species, and that the normal correlation between growth and development may, therefore, be altered at the experimenter's will.

The behaviour of wild-trees in the bare rock areas of the mediterranean region, where over-grazing by sheep and goats is frequent, is described. The systematic clipping of the twigs by the grazing animals determines the dwarf condition of the plants, as well as the maintenance of the juvenile type of growth, for periods of over 50 years, as in some of the cases examined.

The chief characteristics of juvenile growth in the Olive-tree are described, and the relation between xerophily and juvenility is discussed. An attempt is made to give a physiologic interpretation of the phenomena observed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEISSNER, L.
1888 Über Jugendformen von Pflanzen, speciell Coniferen. *Ber. deutsch. bot. Ges.* **6**: 83.
1909 *Handbuch der Nadelholzkunde,* 2. Aufl. Berlin.

BEYERINCK, M. V.
1890 L. Beissner's Untersuchungen bezüglich der Retinisporafrage. *Bot. Zeitung* **48**: 517-533.

BIALE, J. B. & HALMA, F. F.
1938 The use of heteroauxin in rooting of subtropicals. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **35** (1937): 443-447.

BLAIR, D. S., MAC ARTHUR, MARY & NELSON, S. H.
1956 Observations in the growth phases of fruit trees. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **67**: 75-81.

CARRIÈRE, E. A.
1867 *Traité général des Conifères.* Paris.

DIJKMAN, M. J.
1951 *Hevea.* Miami.

DOORENBOS, J.
1954 «Rejuvenation» of *Hedera Helix* in graft combinations. *Proc. Koninkl. Nederl. Akademie van Wetenschappen.* Series C. **57** (1): 99-102.

DORAN, W. L., HOLDSWORTH, R. P. & RHODES, A. D.
1940 Propagation of white pine by cuttings. *Amer. Journ. For.* **38**: 817.

FERWERDA, F. P.
1952 A possible explanation of the divergence between juvenile type budgrafts and their seedling mother trees in *Hevea. Euphytica* **2**: 15-24.

FRITZSCHE, R.
1948 Untersuchungen über die Jugendformen des Apfel- und Birnbaumes und ihre Konsequenzen für die Unterlagen- und Sortenzüchtung. *Ber. schweiz. bot. Ges.* **58**: 207-267.

FROST, HOWARD B.
1938 Nucellar embryony and juvenile characters in clonal varieties of *Citrus. Journ. Hered.* **29**: 423-432.

GARDNER, F. E.
1929 The relation between tree age and rooting of cuttings. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **26**: 101-104.

GOEBEL, K.
1900 *Organography of Plants.* Authorized english edition by Isaac B. Balfour. Part. I. Clarendon Press. Oxford.

GRACE, M. H.
1939 Vegetative propagation of Conifers. I. Rooting of cuttings taken from the upper and the lower regions of a Norway spruce tree. *Can. Journ. Res.* **17**: 178-180.

HIEMELEERS, J.
1953 Les hormones en fructiculture. *Rev. Agron. Brux.* **6**: 1030-1053.

JEFFREY, E. C.
1930 *The anatomy of woody plants.* Univ. of Chicago Press. Chicago, Illinois.

KEMMER, E.
1947 Über Blattmodifikationen bei Apfelgehölzen. *Züchter* **17-18**: 378-382.
1950 Zur Frage der Blattmodifikationen beim Apfel. *Züchter* **20**: 153-156.
1950a Beitrag zur Frage der «Jugendform» bei Apfelgehölzen. *Züchter* **20**: 302-305.
1953 Über das primäre und das fertile Stadium bei Apfelgehölzen. *Züchter* **23**: 122-127.

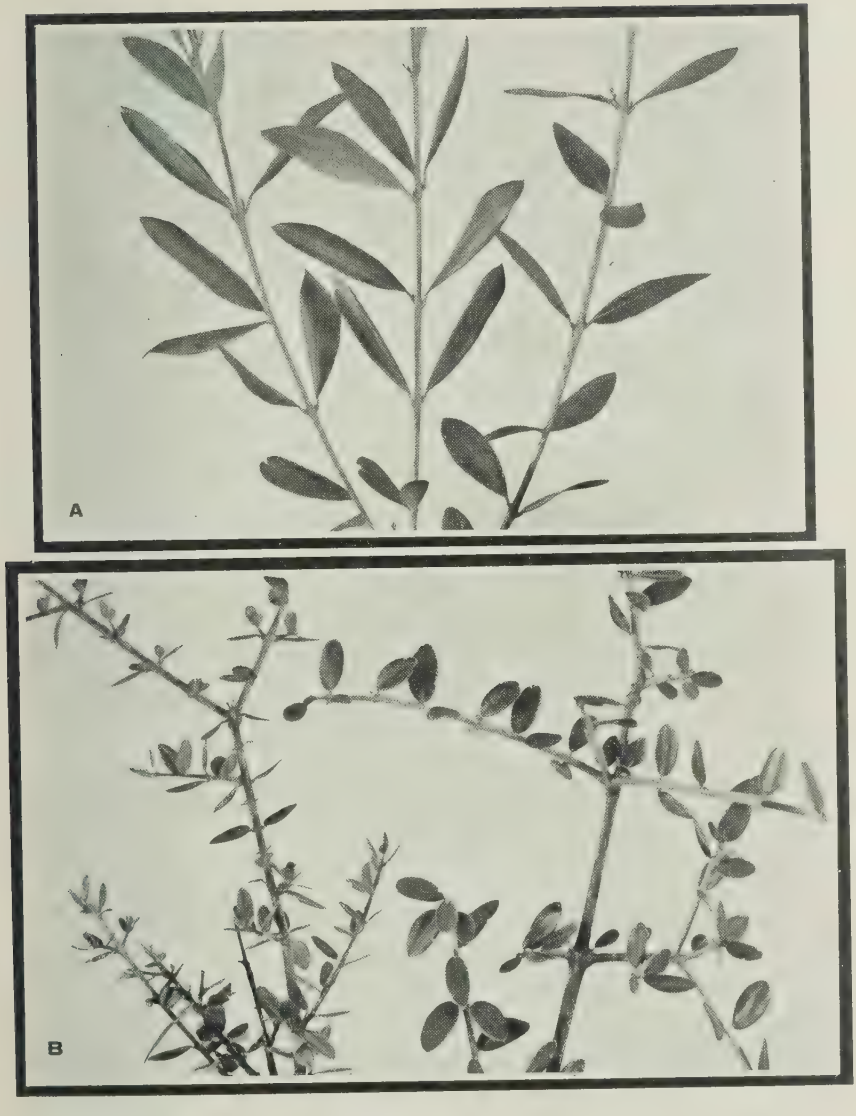
KEMMER, E. & THIELE, I.
1954 Entwicklungsfragen bei Apfelgehölzen. *Züchter* **24**: 346-352.

MICHURIN, I. V.
1949 *Selected Works.* Foreign Languages Publishing House. Moscow.

MIYAJIMA, H.
1951 Studies on the propagation of Hinoki *(Chamaecyparis obtusa)* by cuttings. Effect of the age of the parent tree on the rooting of cuttings. *Mtg. Jap. For. Soc.* **59**: 71 (Cit. de *Forestry Abstr.* **13**: 2945. 1952).

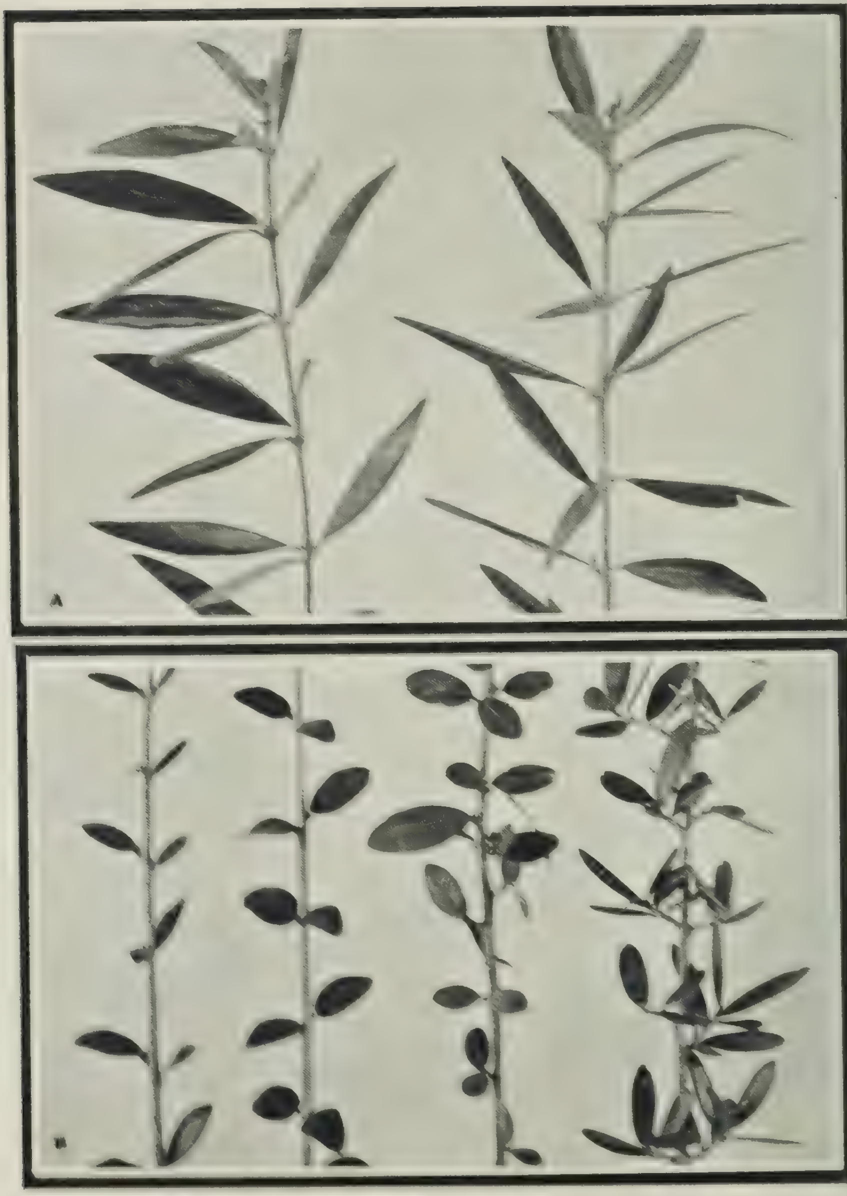
MUCKADELL, M. S. DE
1954 Juvenile stages in woody plants. *Physiol. Plant.* **7**: 782-796.

NATIVIDADE, J. V.
1943 A heterofilia da oliveira do ponto de vista da propagação vegetativa. *Agron. Lusitana* **5** (2): 147-185.
NATIVIDADE, J. V. & SANCHES COELHO, J. M. NATIVIDADE
1946 Propagação vegetativa da oliveira (*Olea europaea* L.). *Agron. Lusitana* **8** (2): 123-129.
OLDÉN, E. J.
1952 Utvecklingstadierna hos äpplefröplantor. *Sver. Pomol. Fören. Arsskr. 1952, 1953*: 130-136. (Cit. de *Hort. Abstracts* **23**: 3834: 1953).
OLIVER, E. S.
1939 Atavistic forms of various species of trees. *Bot. Gazette* **100** (3): 563-575.
PASSECKER, F.
1940 Jugend- und Altersform bei der Aprikose und anderen Obstarten. *Gartenbauwirtsch.* **14**: 614-625.
1944 Jugend- und Altersformen bei den Obstgehölzen. *Gartenbauwiss.* **18**: 219-230.
1947 Entwicklungsphasen und vegetative Vermehrung holziger Gewächse. *Zbl. ges. Forrst- u. Holzwirtsch.* **70**: 270-292.
1952 Geschlechtsreife, Blühwilligkeit und Senilität bei holzigen Gewächsen. *Züchter* **22**: 26-33.
RESENDE, F.
1954 Influence, in grafting, of the hypobiont on flowering of the epibiont. *Port. Acta Biologica* Ser. A, **4** (1): 91-97.
STOUTEMYER, V. T., MANEY, T. J. & PICKETT, B. S.
1935 Root formation in softwood cuttings of apple. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **32**: 343-346.
1936 Some observations on the production of own-rocted apple stocks from root cuttings. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **33**: 350-354.
STOUTEMYER, V. T., O'ROURKE, F. L. & STEINER, W. M.
1944 Some observations on the vegetative propagation of honey locust. *Journ. For.* **42**: 32-36.
THIMANN, K. V. & DE LISLE, A. L.
1939 The vegetative propagation of difficult plants. *Journ. Arnold Arboretum* **20**: 116-136.
WHYTE, R. O.
1939 Phasic development of plants. *Biological Reviews* **14**: 51-87.



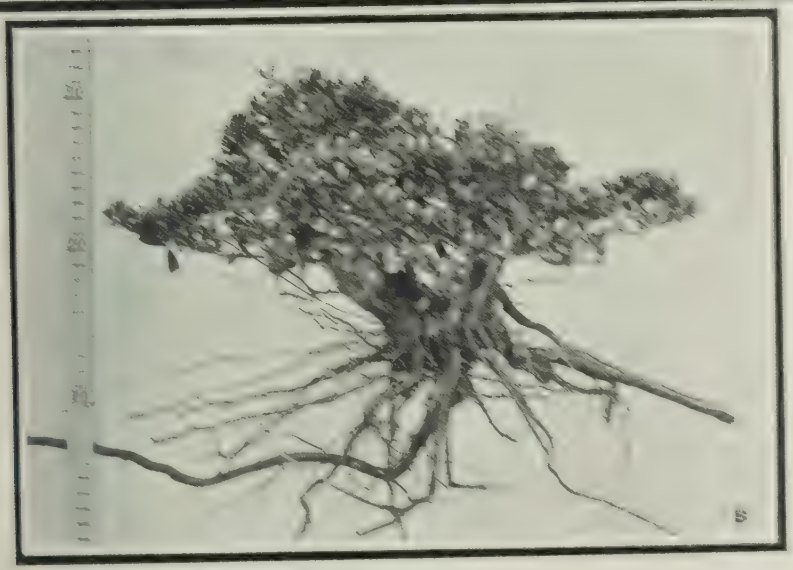
Olea europaea L.

A — Folhas do tipo adulto. B — Ramos na fase juvenil. (Plantas de semente).



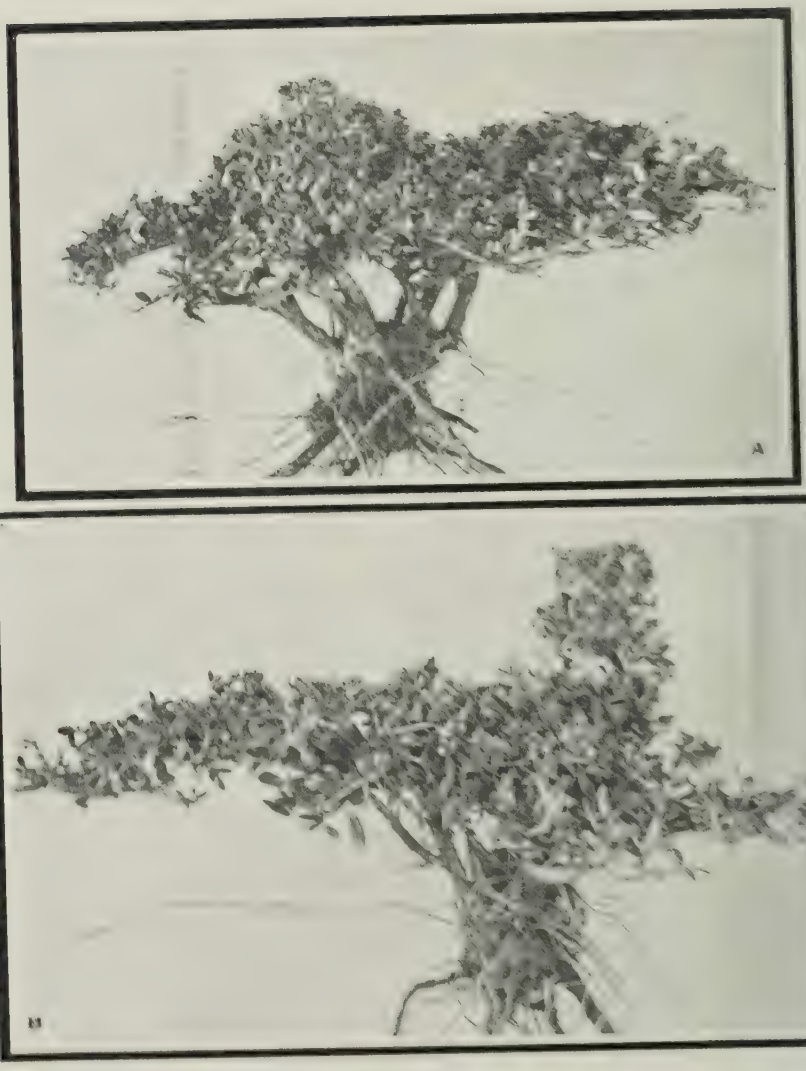
Olea europaea L.

A — [illegible] B — Ramos na fase juvenil [illegible]



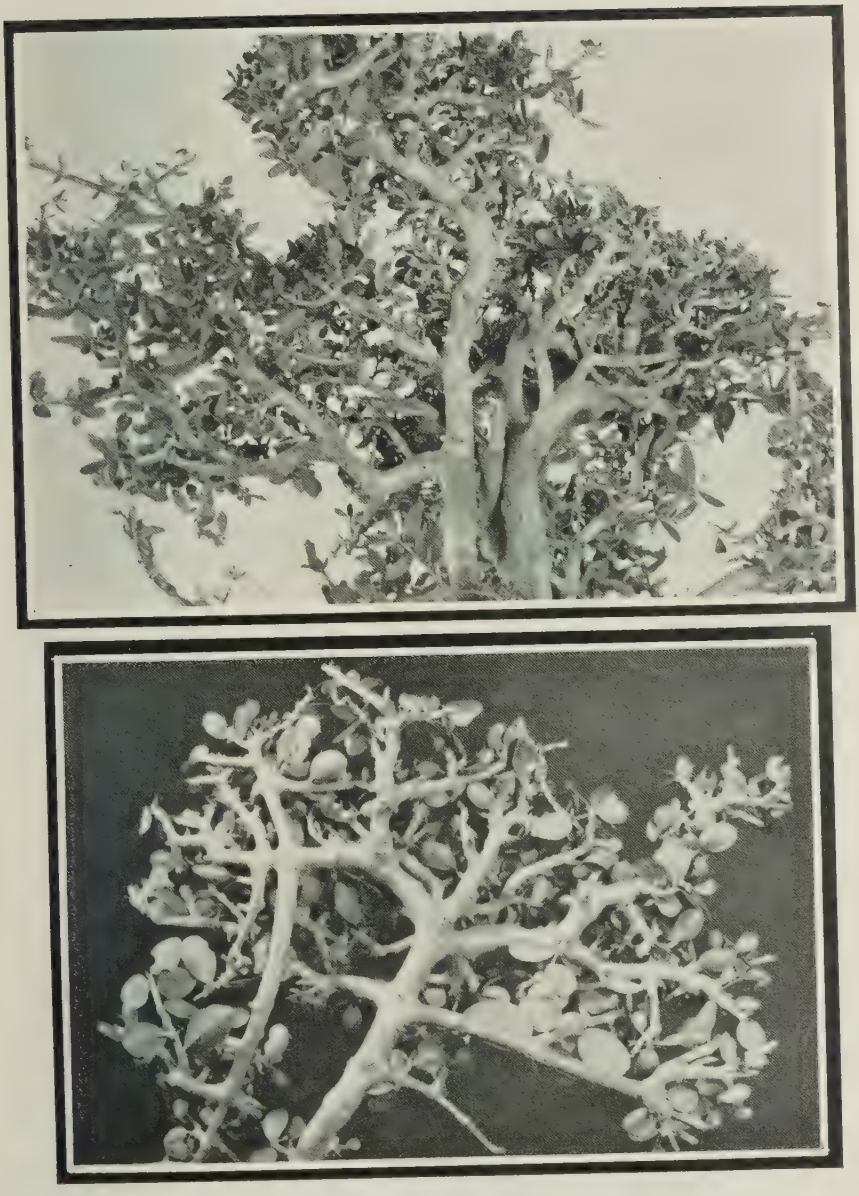
Olea europaea L.

Plantas arás, na fase juvenil.
A — Oliveira com 82 anos. B — Oliveira com 28 anos.



Olea europaea L.

Plantas anãs, na fase juvenil.
A — Oliveira com 48 anos. B — Oliveira com 38 anos.



Olea europaea L.

Aspectos da parte inferior da copa das plantas anãs.

ANTIBIÓTICOS, VITAMINAS E OUTROS FACTORES NO DESENVOLVIMENTO DO *HYLOTRUPES BAJULUS* (L.)

I

POR *ALBERTO COUTINHO SARAIVA*
(Laboratório Nacional de Engenharia Civil)

INTRODUÇÃO E APRECIAÇÃO GERAL

O *Hylotrupes bajulus* (L.), que é o maior inimigo dos madeiramentos das construções na zona temperada do hemisfério norte, tem, como se sabe, um ciclo de vida muito longo (alguns anos), o que dificulta a realização de ensaios dos produtos preservativos utilizando como «material» de prova o próprio insecto vivo (larva).

Por isso os investigadores alemães, que primeiro enfrentaram o problema, se dedicaram a procurar, não apenas uma técnica vulgar de criação laboratorial, com as usuais determinações dos graus óptimos de temperatura e humidade, mas também factores nutritivos de aceleração do desenvolvimento.

Ao tomar conta, há três anos, no Laboratório Nacional de Engenharia Civil, do estudo dos insectos xilófagos e seus métodos de ensaio, tive de encarar o mesmo problema, tendo começado por procurar reunir — com pouco sucesso, aliás — a bibliografia fundamental.

A experiência I representa a minha primeira tentativa para criar o insecto no laboratório, tomando por base uns tópicos, que me tinham sido transmitidos, do trabalho basilar do Dr. GÜNTHER BECKER (1).

Fragmentária, dispersa, tergiversante — autêntico tactear num terreno para mim novo e, como vimos, quase que indocumentado —, ela permitiu-me, no entanto, esclarecer muitos pontos relativos a posturas, impregnação de peptona, furos de «enlarvamento», influência das temperaturas negativas, etc., dominar, enfim, pode dizer-se que completamente, a técnica da criação, preenchendo, por modos às vezes originais, as não-poucas lacunas daquela escassíssima informação.

Foi graças a ela, principalmente, que as outras experiências puderam ser concebidas e levadas a cabo duma maneira homogénea e especializada, permitindo ilações mais seguras e progressivas.

Entretanto havia conseguido obter o próprio texto do trabalho acima citado (1) e também outro precioso trabalho do mesmo autor (2), completando-se assim toda a bibliografia que ainda agora conheço sobre o assunto e sobre a qual baseei as experiências adiante apresentadas.

Por consequência, estas experiências constituem, por assim dizer, a continuação das que o meu ilustre colega Dr. Günther Becker, chefe da Secção de Preservação de Madeiras do Laboratório Federal de Ensaio de Materiais (*Bundesanstalt für Materialprüfung*), de Berlim, expôs e resumiu nos dois trabalhos citados, as quais levaram ao estabelecimento dos seguintes factores aceleradores do desenvolvimento:

a) factores alimentares: peptona, levedura e vitaminas B_1 e B_2;
b) factores climáticos: temperatura, 30°-28° C, e humidade próxima da saturação do ar (92 a 95 %), com abaixamentos periódicos de uma e outra para as larvas crescidas.

Acrescentam-se aqui dois outros factores aceleradores, alimentares — os antibióticos e a vitamina T —, ambos já anteriormente usados com o mesmo fim, aqueles nos animais domésticos, esta (que me consta ter sido primeiro descoberta nos fungos associados às térmites) inclusivamente nas próprias crianças. A novidade reside apenas na sua aplicação aos coleópteros xilófagos e, em especial, ao *Hylotrupes bajulus*, nos quais suponho que nunca haviam sido experimentados e onde a existência de um grave problema de aceleração (no *Hylotrupes*), insatisfatòriamente solucionado, sugeria naturalmente o seu emprego.

De resto, a influência dos antibióticos e das vitaminas, adiante esboçada apenas, está a ser extensamente explorada noutras experiências já em curso, que constituem o seguimento natural destas.

Dos resultados a seguir expostos, depreendo que os antibióticos se poderão vir a dividir em três grupos, consoante a sua acção no desenvolvimento dos insectos (*Hylotrupes*):

1) os aceleradores, como a aureomicina (clorotetraciclina) e, em menor grau, a penicilina;
2) os inibidores, do tipo da estreptomicina; e
3) os mais ou menos indiferentes, como a cloromicetina (cloranfenicol) e a terramicina (oxitetraciclina), esta última apesar da sua aparente afinidade química com a aureomicina.

À acção aceleradora dos antibióticos veremos adiante que está associado um efeito normalizador do aspecto e do tamanho, diminuidor das aberrações e dos enfêzamentos, sem redução sensível, aparentemente, da longevidade e da fertilidade.

Da vitamina T são de esperar ainda melhores resultados do que os já conseguidos na experiência V, assim que tiver esclarecido as questões de dose e forma de preparação. A dificuldade de obter as substâncias puras, tanto vitaminas como antibióticos, prejudicou-me o trabalho.

Dos factores climáticos, o uso mais moderado e mais judicioso do frio do que o proposto pelos investigadores alemães permitiu-me demonstrar, na experiência II, a possibilidade prática de obter emergências abundantes de adultos em pleno inverno — na realidade, talvez em qualquer época do ano — e, portanto, de efectuar regularmente ensaios da acção preventiva dos preservativos duas ou mais vezes por ano. É possível que isto esteja relacionado com o clima mais temperado do nosso país: quer dizer, pode ser que ambos os resultados, os alemães e os nossos, sejam igualmente bons, cada um para o seu país, pois que o mesmo insecto há-de forçosamente ter uma habituação diferente em cada um. De qualquer modo, o inconveniente para o nosso caso das temperaturas francamente negativas aparece bem realçado na experiência I e numa outra experiência com larvas crescidas, aqui não incluída.

Também se me afigura revestir algum interesse a indicação, dada pela experiência V, de que as larvas que sobrevivem à absorção de preservativos manifestam, pelo menos em certas condições, maior poder de recuperação do que as larvas normais, pois que implícito, aí, está o que pode suceder em consequência de tratamentos deficientes: uma gradual aquisição de resistência aos preservativos. É claro que, a este respeito, não devemos ter muito a recear durante bastante tempo, em virtude, não só da extensa gama de produtos e formas de tratamento à nossa disposição,

como também da demora das gerações do *Hylotrupes* e ainda da estrita localização do *habitat*, fixo. Não é, evidentemente, o caso da *Musca domestica* L. Mas vale a pena registar a indicação.

A relação, aliás variável, evidenciada pela experiência III, entre a espessura das camadas de crescimento do nosso pinho bravo e a sua adequabilidade para o desenvolvimento do *Hylotrupes* interessa tanto à criação laboratorial como à aplicação prática da madeira nas construções.

A extensão ou demora do ciclo de vida do *Hylotrupes* entre nós, até agora indeterminada e vaga, começa a ter precisão experimental com os dados colhidos na experiência I e outros correlacionados.

Dos pontos concernentes à técnica laboratorial, o mais digno de destaque parece-me que é a rejeição completa de um tipo de furo de «enlarvamento» usado nalguns ensaios alemães: o furo feito na face superior e deixado aberto. É incontestável que, tanto o comprovado geotactismo negativo das larvas recém-nascidas do *Hylotrupes*, como o seu também demonstrado fototactismo negativo, tornam ùnicamente recomendável o furo de tôpo, junto ao bordo inferior, e depois tapado.

Quanto às consequências das humidades altas no desenvolvimento e na mortalidade das larvas do *Hylotrupes* e à existência de uma relação directa entre o peso das larvas e a sua transformação em adultos, os resultados adiante expostos apenas confirmam os já apresentados por Becker nos dois trabalhos citados. E certamente que a hiperproteínose referida na experiência I já deve ter sido denunciada pelo mesmo notável investigador.

EXPERIÊNCIA I
(1954-1957)

Consequências de humidades muito altas, da hiper-impregnação com peptona, do tipo de furo de «enlarvamento» e da refrigeração prolongada dos ovos a temperaturas negativas. Pinho bravo, casquinha, criptoméria e choupo.

Material e métodos em ambiente condicionado

Provêtes principalmente de pinho bravo e casquinha, poucos de criptoméria e choupo, todos tirados do alburno de madeira sem nós e já com alguns anos de cortada; os de pinho bravo,

além disso, com as zonas de primavera moderadamente largas. Geralmente com $5 \times 2{,}5 \times 1{,}5$ cm ou $5 \times 3{,}5 \times 2$ cm, poucos com $10 \times 3{,}5 \times 2$ cm, cortados de modo a ficarem com os aneis de crescimento mais ou menos paralelos às duas faces maiores, dispostas horizontalmente. Alguns provêtes com 4, outros com 5 furos (para meter outras tantas larvas recém-nascidas), os furos sendo, ora

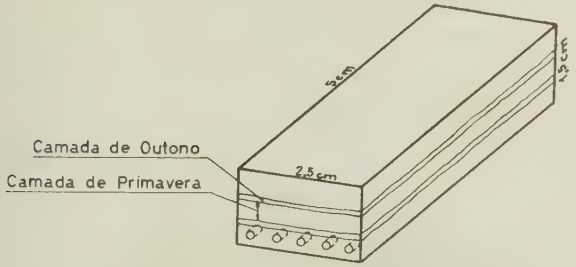


Fig. 1 — Provête de pinho bravo com 5 furos num tôpo para introdução das larvas.

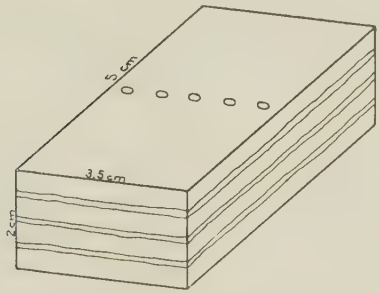


Fig. 2 — Provête de pinho bravo com 5 furos na face superior para introdução das larvas.

feitos num tôpo, junto à face inferior, portanto paralelos às fibras, e tapados com algodão (depois de neles introduzidas as larvas), ora na face superior, portanto perpendiculares às fibras, e deixados abertos após a introdução das larvas. Furos de tôpo, com 1-2 mm de diâmetro e 3 a 5 mm de profundidade; furos na face superior, com 2 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade (figs. 1 e 2).

Uns provêtes de madeira sem a adição de qualquer substância, outros impregnados, alguns dias antes de neles introduzidas as larvas, com o soluto aquoso a 1,5 % de peptona granulada Ko. 1, da firma Friedrich Witte, de Rostock, comprada pelo Laboratório para a cultura de fungos xilófagos por volta de 1950, portanto 4 anos antes de aplicada. A impregnação de peptona variando desde 1/2 hora de vácuo quase completo (perto de 76 cm de mercúrio) e 2 horas de imersão subsequente a 2-2,5 horas de vácuo e 6-24 horas de imersão, empregando-se ainda, por vezes, solutos retardados e já usados numa impregnação anterior.

Todos estes provêtes infestados com larvas recém-nascidas provenientes de ovos postos por adultos criados em condições naturais — nas casas do vizinho Bairro de Alvalade ou nas madeiras do Laboratório. Ovos incubados em estufa, a 28° C e 92-95 % de humidade relativa (sobre o soluto saturado de $K_2 SO_4$), nalguns casos prèviamente refrigerados na geleira, entre —6° e —12° C e a uma humidade de pré-saturação, durante 5 a 19 dias.

Data da infestação dos provêtes com as larvas: desde 28 de Julho a 3 de Setembro de 1954.

Provêtes, depois de infestados com as larvas, metidos em recipientes de vidro com tampa, tendo no fundo o soluto saturado de $K_2 SO_4$, produtor de uma humidade relativa variável entre 92 e 95 %.

Temperatura: nos primeiros 9 meses (Setembro de 1954 a Julho de 1955), de 28° a 24° C, com 2 dias por semana a 20° C durante os últimos 4 desses 9 meses; daí em diante, temperatura normal das salas de trabalho do Laboratório, com aquecimento no inverno, isto é, em média, 20° C aproximadamente.

Sobrevivência das larvas recém-nascidas em ambiente condicionado

No Quadro I vê-se que a mortalidade inicial, em geral pequena, aumentou com a aproximação do soluto saturado de sulfato de potássio: na camada inferior, fortemente infectada de fungos, ela é tripla da verificada na camada superior, òbviamente seca. Isto deveu-se ao facto de as camadas estarem separadas por tampas invertidas de vidro que quase impediam a passagem do ar de baixo para cima e *vice-versa*, criando assim «estratos» de humidade

muito diferente, quase saturada em baixo, relativamente pequena em cima, conforme se podia notar pela infecção fúngica e pela simples apalpação dos provêtes. Portanto, a humidade muito elevada, associada à proliferação de fungos xilófagos, revelou-se um factor desfavorável à sobrevivência das larvas recém-nascidas.

QUADRO I

Recipiente n.º 1

Provêtes de pinho bravo, de 5 × 2,5 × 1,5 cm, com 4 furos no tôpo, tapados. Furos de 1-2 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade. Impregnação breve de peptona: 1/2 hora de vácuo e 2 horas de imersão subsequente.

Camadas de provêtes	N.º de provêtes	N.º de larvas introduzidas em 28/30-VII-1954	Dados colhidos em 18-VIII-1954 (18-20 dias depois)		Mortalidade inicial %
			N.º de larvas mortas nos furos	N.º de larvas vivas dentro dos provêtes *	
1.ª camada (em cima)	6	24	3	21	12,5
2.ª camada (no meio)	13	52	9	43	17
3.ª camada (no meio)	2	9	2	7	22
4.ª camada (em baixo) **	12	47	18	29	38
Totais	33	132	32	100	Média: 24 %

* Número máximo estimado, «não observado», pois se abriram apenas alguns provêtes-amostras.

** Provêtes muito próximos do soluto saturado de K_2SO_4, todos com abundante desenvolvimento de fungos à superfície, que só pela exposição prolongada ao sol se conseguiram eliminar.

Nos provêtes de casquinha do recipiente n.º 2 (Quadro II), a maioria das larvas estavam mortas à entrada dos orifícios que, a partir dos furos onde haviam sido colocadas, tinham começado a abrir na madeira, umas vezes tendo chegado a fazer penetrar apenas a cabeça, outras vezes mal havendo esboçado o orifício; diversamente, nos provêtes de pinho bravo (mesmo Quadro), muitas larvas

haviam penetrado até uma distância igual ao seu comprimento. Mas em ambos os casos, todas as larvas mortas dentro da madeira (portanto, tendo roído e ingerido madeira, pois é assim que elas abrem os orifícios) apresentavam o mesmo aspecto: túrgidas e castanhas, da cor exacta da peptona, como se se tratasse de uma intoxicação alimentar por esta provocada, de uma impossibilidade de eliminação por excesso de dose. Na casquinha, mais permeável e, por consequência, tendo absorvido maior quantidade, teria havido morte mais rápida.

QUADRO II

Recipiente n.º 2

Provêtes de pinho bravo e de casquinha, uns de $5 \times 2{,}5 \times 1{,}5$ cm com 4 furos (4 larvas) cada, outros de $10 \times 3{,}5 \times 2$ cm com 5 furos (5 larvas) cada. Furos de tôpo, tapados, com 1-2 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade. Impregnação prolongada (2 a 2,5 horas de vácuo e 6 a 24 horas de imersão subsequente) de peptona, por vezes aproveitando solutos já usados na impregnação anterior.

Camadas	Provêtes	Larvas introduzidas em 30/31-VII-1954	Larvas encontradas mortas em 19/20-VIII-1954	Mortalidade total %
1.ª (em cima)	4 de casquinha	17	17	100
2.ª (no meio)	15 de casquinha	75	75	100
3.ª (em baixo)	16 de pinho bravo	72	72	100
Totais	35	164	164	

Assim interpretei os resultados do recipiente n.º 2. A impregnação de peptona excessivamente prolongada e aproveitando ainda, por vezes, solutos já usados, para mais utilizando uma qualidade de peptona que não é a adequada para as larvas recém-nascidas, teria levado à concentração, na madeira, de uma dose exagerada para as larvas recém-nascidas, provocando uma hiperprotèinose, por assim dizer. Os resultados dos restantes recipientes vieram confirmar esta hipótese.

Os resultados do recipiente n.º 3 (Quadro III) foram semelhantes aos observados no recipiente n.º 2: mortalidade próxima de 100 %, levemente maior na casquinha, mais permeável do que o pinho bravo; larvas túrgidas e castanhas, algumas já bastante

afastadas dos orifícios de entrada na madeira; mortalidade inicial reduzida. Causa suposta, a mesma: dose excessiva de peptona, para mais não apropriada e retardada.

No recipiente n.º 4 as larvas que procurei no interior dos provêtes (Quadro I /) estavam vivas, mesmo no caso dos provêtes prolongadamente impregnados de peptona, o que suponho ser devido ao facto de ter diminuído o tempo de imersão subsequente

QUADRO III

Recipiente n.º 3

Madeiras, furos e impregnação iguais aos do recipiente n.º 2. Todos os provêtes de 5×3,5×2 cm, com 5 furos (5 larvas) cada. Furos com 5 mm de fundo. Apenas duas camadas de provêtes.

Camadas	Provêtes	Larvas introduzidas em 2/3-VIII-1954	Larvas encontradas mortas em 23/24-VIII-1954	Mortalidade inicial %	Mortalidade total %
1.ª A (em cima)	7 de pinho bravo	35	28	8,6	80
1.ª B » »	8 de casquinha	38	34	2,6	89,5
2.ª A (em baixo)	9 de pinho bravo	45	*~45	**	~100
2.ª B » »	8 de casquinha	40	*~40	**	~100
2.ª C » »	8 de pinho bravo	40	*~40	**	~100
2.ª D » »	1 de pinho bravo	5	5	**	~100
Totais	41	203			Média: ~100 %

* Tendo ficado por explorar um ou outro furo em cada camada de provêtes, não se pode afirmar que estivessem, com certeza, todas mortas.

** As mortas inicialmente, não contadas à parte.

ao vácuo e de haver usado aqui sòmente solutos frescos, e não também retardados, conforme acontecera nos recipientes n.º 2 e 3. A grande diferença na mortalidade inicial dos dois grupos de provêtes explico-a pela influência, não apenas da relativamente prolongada impregnação de peptona, mas também do tipo de furo em que as larvas tinham sido introduzidas nos provêtes: no 1.º grupo, furos baixos (3 mm de fundo), feitos na face superior (perpendiculares às fibras) e deixados abertos após a introdução das larvas; no 2.º grupo, furos mais fundos (5 mm), feitos num tôpo (paralelos às fibras), junto à face inferior (a 3-4 mm desta), e tapados com algodão após a introdução das larvas. No primeiro caso, as larvas,

não só ficam mais expostas à luz e ao ar, como ainda roem paralelamente às fibras e de cima para baixo, contrariando os seus fototactismo e geotactismo negativos, largamente comprovados por todas as observações anteriores que sobre elas fiz. A influência deste novo factor, o tipo de furo, ressalta nìtidamente do exame dos Quadros seguintes.

QUADRO IV

Recipiente n.º 4

Provêtes de pinho bravo e de casquinha, de 5×3,5×2 cm, com 5 furos (5 larvas) cada, uns furos sendo feitos num tôpo (com 2×5 mm) e tapados, outros na face superior (com 2 mm de diâmetro por 3 mm de fundo) e abertos. Uns provêtes impregnados prolongadamente de peptona mas com menos tempo de imersão subsequente e sempre com solutos frescos, outros sem a adição de qualquer substância.

Grupos	Camadas	Provêtes	Larvas introduzidas em 6 de Agosto (1954)	Larvas mortas nos furos em 25 de Agosto (1954)	Mortalidade inicial %	Mortalidade inicial média %
1.º GRUPO Com peptona e furos na face superior, abertos	1.ª A (em cima)	4 { 1 pinho bravo, 3 casquinha	18	11	69	51 Levemente maior na casquinha
	1.ª B » »	14 { 4 pinho bravo, 10 casquinha	64	31	48 pinho 40 casquinha 52	
2.º GRUPO Sem peptona e furos no tôpo, tapados	2.ª A (no meio)	10 { 5 pinho bravo, 5 casquinha	50	9	18	25 Aproximadamente igual no pinho e na casquinha
	2.ª B » »	4 { 2 pinho bravo, 2 casquinha	20	12	60	
	3.ª (em baixo)	10 { 5 pinho bravo, 5 casquinha	48	9	18,75	
	Totais	42 { 17 pinho bravo, 25 casquinha	200	72	Média: 36 %	

No Quadro V, a influência do tipo de furo é flagrante, tanto nos provêtes de pinho bravo como nos de casquinha: em conjunto, a mortalidade inicial foi de 93 % nos furos na face superior, abertos, e apenas de 23 % nos de tôpo, tapados. Pelo contrário, a

influência da espécie da madeira não foi significativa, pois a mortalidade inicial foi, em média, de 80 % no pinho bravo e 75 % na casquinha.

Nas restantes camadas do recipiente n.º 5 (2.ª parte) não empreguei a peptona e usei apenas furos abertos. Os factores que aí variaram foram a espécie de madeira e a infecção do «azulado».

QUADRO V

Recipiente n.º 5 (1.ª parte)

Todos os provêtes impregnados prolongadamente de peptona mas usando sempre solutos frescos e diminuindo a imersão subsequente ao vácuo para 3 a 4 horas. No resto (madeiras, provêtes e furos) também em condições iguais às do recipiente n.º 4.

Camadas	Provêtes		Larvas introduzidas em 10 de Agosto (1954)	Larvas encontradas mortas nos furos em 1-X-1954	Mortalidade inicial %
1.ª (em cima)	12	6 pinho bravo — 5 c/ *furos abertos*	25	24	96
		6 pinho bravo — 1 » » *tapados*	5	0	0
		6 casquinha — 4 » » *abertos*	20	18	90
		6 casquinha — 2 » » *tapados*	8	3	37,5
Totais	12		58	45	

* As larvas que tinham penetrado na madeira estavam vivas, a despeito da impregnação ainda um tanto prolongada de peptona.

Os resultados foram muito estranhos (Quadro VI): nenhuma larva conseguiu penetrar no pinho bravo, hospedeiro principal da espécie, no nosso País, mas uma minoria penetrou no choupo, considerado pouco susceptível de ataque, e relativamente bastantes abriram extensas galerias na criptoméria, tida por imune ou, pelo menos, como altamente resistente aos insectos xilófagos (!). Estas larvas apresentavam-se, no fim das galerias, todas mirradas, como se tivessem morrido de fome ou de sêde. Não contém a criptoméria os alimentos necessários? Com efeito, o aspecto das larvas não era o de intoxicadas, mas antes o de esfomeadas e deshidratadas.

Além de outros possíveis factores, indeterminados, a enorme mortalidade inicial verificada em todos os casos, nesta parte do

recipiente n.º 5, deve atribuir-se sobretudo ao tipo de furo. Note-se que as larvas eram provenientes de ovos postos pelos mesmos casais e incubados do mesmo modo que as utilizadas nos recipientes anteriores. A mortalidade inicial total nos provêtes da 3.ª camada não permitiu que se manifestasse qualquer possível influência do « azulado ».

QUADRO VI

Recipiente n.º 5 (2.ª parte)

Provêtes sem peptona e com furos na face superior, abertos.

Camadas	Provêtes	Madeira	Larvas introduzidas em 10-VIII-1954	Larvas encontradas mortas nos furos em 4/5 - X - 1954	Larvas encontradas mortas dentro da madeira em 4/5 - X - 1954	Mortalidade inicial %	Mortalidade total %
2.ª A (no meio)	10	criptoméria	50	39	11	78	100
2.ª B » »	9	choupo	45	42	3	93,5	100
3.ª A (em baixo)	5	pinho bravo sem « azulado »	23	23	—	100	100
3.ª B » »	10	pinho bravo com « azulado »	50	50	—	100	100
Totais	34		168				

QUADRO VII

Recipiente n.º 6 (1.ª parte)

Nos provêtes com peptona, impregnação prolongada mas com solutos frescos e com a imersão subsequente ao vácuo reduzida para 3 a 4 horas.

Parâmetros	Camadas	Provêtes		Larvas introduzidas em 11-VIII-1954	Larvas mortas nos furos em 6/ / - X - 1954	Mortalidade inicial %	Mortalidade inicial média %
Furos no tôpo, tapados; com peptona	1.ª A (em cima)	9	5 pinho bravo	25	7	28	33
			4 casquinha	20	8	40	
Furos na face superior, abertos; com e sem peptona	1.ª B » »	9	2 pinho bravo sem peptona	10	10	100	65
			7 casquinha com peptona	33	17	51,5	
Totais		18		88			

No Quadro VII vê-se que a mortalidade inicial nos furos feitos na face superior e deixados abertos foi dupla da verificada nos furos feitos num tôpo e a seguir tapados. É considerável a diferença existente entre dois grupos de provêtes da mesma madeira, com a mesma impregnação e situação no recipiente, apenas divergindo nos furos (casquinha: 40 % para 51,5 %).

QUADRO VIII

Recipiente n.º 6 (2.ª parte)

Parâmetros	Camadas	Provêtes	Madeira	Larvas introduzidas em 11 de Agosto (1954)	Larvas mortas nos furos em 6/7 de Outubro (1954)	Mortalidade inicial %
Furos no tôpo, tapados; com peptona	2.ª A (por baixo)	2	pinho bravo	10	3	30
Furos na face superior, abertos; sem peptona	2.ª B » »	2	pinho bravo	10	10	100
Totais		4		20		

QUADRO IX

Recipiente n.º 6 (3.ª parte)

Parâmetros	Camadas	Provêtes	Madeira	Larvas introduzidas em 11 de Agosto (1954)	Larvas mortas nos furos em 6/7 de Outubro (1954)	Mortalidade inicial %
Furos no tôpo, tapados	2.ª C (por baixo)	3	casquinha com peptona	15	0	0
Furos na face superior, abertos	2.ª D » »	5	casquinha com peptona	25	22	88
Totais		8		40		

Nas outras partes do recipiente n.º 6 (Quadros VIII e IX) tive o cuidado de empregar larvas provenientes da mesma fêmea e da

QUADRO X

Recipiente n.º 7

Provêtes com uma breve impregnação de peptona: 1/2 hora de vácuo e 2 horas de imersão subsequente.
Furos na face superior, abertos. Larvas provindas de ovos refrigerados na geleira.

Camadas	Provêtes	Madeira	Larvas introduzidas de 31 de Agosto a 3 de Setembro de 1954	Larvas encontradas mortas nos furos em 7 de Outubro de 1954	Mortalidade inicial %	Mortalidade inicial média %	Número de larvas e dias que os ovos donde as larvas provinham tinham estado na geleira
1.ª A (em cima)	6	3 pinho bravo	7	7	100	93,7	13 larvas — 19 dias
		3 casquinha	9	8	90		3 » — 14 »
1.ª B » »	10	6 pinho bravo	18	18	100	90	22 » — 19 »
							4 » — 14 »
							2 » — 10 »
		4 casquinha	12	9	75		2 » — 5 »
2.ª A (no meio)	12	5 pinho bravo	15	14	93	73,5	6 » — 14 »
		7 casquinha	19	11	58		28 » — 10 »
3.ª A (em baixo)	8	4 pinho bravo	12	4	33	33	24 » — 10 »
		4 casquinha	12	4	33		
3.ª B » »	8	4 pinho bravo	11	5	45	30	23 » — 5 »
		4 casquinha	12	2	16		
Totais	44	22 pinho bravo	127	82	76	Média: 64,6 %	
		22 casquinha			53		

mesma postura e na terceira parte, em especial, todas as condições eram absolutamente iguais com excepção do tipo de furo. Em ambos os casos a diferença de mortalidade é muito grande, demonstrando abundantemente a influência do tipo de furo.

No recipiente n.º 7 o factor constante «furos na face superior e abertos» (Quadro X) deve ter contribuido para a mortalidade inicial considerável verificada em todos os casos, que é precisamente maior do que a que se encontrou no recipiente n.º 1, com a mesma breve impregnação de peptona mas com furos no tôpo e tapados. Mas o que se vê, além disso, no Quadro X, é que o factor variável, «permanência dos ovos na geleira», teve uma influência evidente, pois a mortalidade inicial média diminuiu regularmente à medida que diminuira aquela permanência. Corrobora-se assim o que já havia observado, anteriormente, sobre a incubação: a permanência dos ovos na geleira, a temperaturas entre —6° e —12° C e a humidades próximas da saturação, reduz a vitalidade do embrião e até da larva recém-nascida, aparecendo em ambos os casos o ponto crítico de 10 dias de permanência, para além do qual a mortalidade se eleva bruscamente, até se tornar quase total próximo dos 20 dias (na mortalidade dos ovos, nestas condições, uma das causas é a forte e rápida infecção de fungos oófagos, sem a acção dos quais o simples enfraquecimento do embrião poderia não chegar a produzir uma mortalidade grave).

Verifica-se também no Quadro X que a mortalidade inicial foi quase sempre maior no pinho bravo do que na casquinha, diversamente do que se vira na 1.ª camada do recipiente n.º 3 e no 1.º grupo do recipiente n.º 4, ao passo que no 2.º grupo do recipiente n.º 4 e no recipiente n.º 5 a mortalidade foi aproximadamente igual em ambas as madeiras e no recipiente n.º 6 (1.ª parte) o resultado foi contraditório. A este respeito os resultados são, por consequência, inconclusivos.

Material e métodos em ambiente não condicionado

Em 10 de Agosto de 1954 introduzi 90 larvas em 18 provêtes de pinho bravo e casquinha, uns com, outros sem, peptona e uns com os furos na face superior, abertos, outros no tôpo, tapados, deixando os provêtes expostos à atmosfera natural da sala de trabalho, sem qualquer condicionamento da temperatura e da humidade. Determinada a humidade (da madeira) de 3 provêtes-

-testemunhas, 2 de pinho bravo e 1 de casquinha, viu-se que era de 13,65 % para o pinho bravo e 14,6 % para a casquinha — humidade determinada pelo método clássico da diferença de peso dos provêtes, depois de secos durante 48 horas a 100 ± 2° C.

Sobrevivência em ambiente não condicionado

Os resultados, observados 64 dias depois da introdução das larvas (Quadro XI), indicam uma mortalidade igual no pinho bravo

QUADRO XI

Provêtes expostos ao ar da sala de trabalho (Secção de madeiras, Sector Parasitológico)

Grupos	Parâmetros	Provêtes	Madeira	Larvas introduzidas em 10 de Agosto (1954)	Larvas encontradas mortas nos furos em 13 de Outubro (1954)	Mortalidade inicial %
1.º grupo	Sem peptona e com furos abertos	6	pinho bravo	30	30	100
2.º grupo	Sem peptona e com furos tapados	6	pinho bravo	30	5	16,7
3.º grupo	Com peptona e com furos abertos	6 (3)	pinho bravo	15	13	86,7
		6 (3)	casquinha	15	13	86,7
Totais		18 (15)	pinho bravo	90		
		18 (3)	casquinha			

e na casquinha; menor (entre os provêtes com furos abertos) nos impregnados de peptona do que nos não impregnados, talvez devido à menor secura naqueles; muito maior nos provêtes com furos na face superior, abertos, do que nos que tinham os furos de tôpo e tapados. A acção perniciosa dos furos superficiais, expostos, foi ainda mais forte na sala de trabalho, com muita luz,

do que nos recipientes condicionados, mantidos na meia obscuridade da sala climatizada, o que revela a intervenção desfavorável do factor luz, além do contrariamento da orientação própria da espécie (geotactismo negativo). Por outro lado, a reduzida mortalidade inicial nos provêtes com furos de tôpo e tapados mostra que as larvas recém-nascidas são perfeitamente capazes de resistir a um ambiente seco desde que se encontrem em lugares abrigados e escuros, como normalmente devem encontrar-se em virtude do hábito típico das fémeas, de só pôrem os ovos em fendas estreitas e fundas. Muito maior inimigo do que a secura parece ser a luz.

Ilações relativas à sobrevivência das larvas recém-nascidas em ambos os ambientes

1.ª) A humidade muito elevada (próxima da saturação), quando associada à proliferação de fungos xilófagos, por sua vez gerando aumento de humidade, parece ser uma causa de mortalidade nas larvas recém-nascidas. Deve-se evitar a proliferação de fungos xilófagos nos provêtes de criação do *Hylotrupes*.

2.ª) Pelo contrário, em condições naturais e desde que se encontrem em sítios abrigados e escuros — como normalmente devem encontrar-se, em virtude do hábito de oviposição da espécie — as larvas recém-nascidas parecem mostrar grande resistência à secura. O maior inimigo é provàvelmente a luz — e a deshidratação concomitante —, perante a qual elas revelam, desde que saem dos ovos, conforme inúmeras observações anteriores e posteriores a esta experiência, feitas pelo autor, uma forte fobia.

3.ª) É inconveniente, para a sobrevivência das larvas recém-nascidas, a sujeição prolongada dos ovos a um frio intenso e húmido (temperaturas entre — 6° e — 12° C e humidade de quase saturação), talqualmente o autor verificara, numa experiência anterior, que o era para a natalidade. Além de 10 dias nessas condições, as consequências, para ambos os casos, são graves.

4.ª) Quando impregnada em quantidade excessiva na madeira, a peptona parece deixar de ser assimilada pelas larvas, acumulando-se nos seus tecidos e provocando elevada mortalidade. Usando uma concentração de 1,5 %, a impregnação dos provêtes em meio-vácuo (35 a 40 cm de mercúrio), durante 1/2 hora, seguida da imersão no soluto durante 2 horas, mostrou ser suficiente, ao passo que a impregnação em vácuo quase total (perto de 76 cm

de mercúrio) durante 2 a 2 1/2 horas, seguida de imersão durante 6 a 24 horas, demonstrou ser desastrosa — pelo menos para a qualidade de peptona empregada. É importante empregar apenas solutos frescos: nunca aproveitar solutos retardados ou já usados em impregnação anterior, contendo, portanto, substâncias de extracção da madeira.

5.º) Apesar de se ver adoptado nalguns ensaios alemães, o furo na face superior, baixo e deixado aberto após a introdução das larvas, revelou ser de todo inadequado. As larvas devem ser introduzidas em furos feitos num dos tôpos dos provêtes, junto à face inferior, fundos, e logo tapados com algodão, a fim de resguardá-las da luz e da deshidratação (mòrmente se nasceram num meio de elevada humidade) e permitir-lhes roer perpendicularmente às fibras e de baixo para cima (geotactismo negativo), como é seu hábito.

6.ª) Não se notou diferença significativa constante entre o pinho bravo e a casquinha quanto à sobrevivência das larvas recém-nascidas.

7.ª) A criptoméria mostrou-se realmente inadequada para o desenvolvimento das larvas do *Hylotrupes*, apesar de algumas terem conseguido abrir nela relativamente extensas galerias. O mesmo se verificou aparentemente quanto ao choupo, a despeito das observações em contrário feitas em França. Por isso, nova experiência está em curso para elucidar este ponto.

Emergência dos insectos adultos

Desenvolvimento da experiência

Com excepção dos recipientes n.os 2 e 3, abandonados por causa da mortalidade total ou quase total neles verificada, todos os recipientes atrás indicados foram mantidos sempre, desde o início da experiência até agora, tapados, com o soluto saturado de K_2SO_4 no fundo, quer dizer, à humidade relativa constante, no seu interior, de aproximadamente 92 a 95 %. A temperatura é que, conforme exposto atrás, variou muito: nos primeiros 9 meses (Setembro de 1954 a Junho de 1955), os recipientes foram conservados na sala climatizada, entre 28º e 24º C, com 2 dias por semana a 20º C durante os últimos 4 desses 9 meses; em Junho

de 1955 passaram para a sala de trabalho, não condicionada, apenas aquecida no inverno, mais ou menos à média de 20° C.

Entretanto, devido ao reduzidíssimo tamanho dos provêtes para tão grande número de larvas (a experiência fôra concebida de início ùnicamente para se determinar a sobrevivência das larvas recém-nascidas), muitas foram saíndo dos provêtes e morrendo à míngua, enquanto outras eram devoradas pelas suas semelhantes (é forte o canibalismo larvar nesta espécie), dando lugar a que muito poucas alcançassem o estado de completamente desenvolvidas e pudessem, por consequência, transformar-se em insectos adultos. A incidência desta circunstância desfavorável deu-se em todos os recipientes, embora desigualmente, consoante a disposição dos provêtes em camadas, limitadoras dos movimentos e dos recursos alimentares das larvas. Com efeito, como, devido às pequenas dimensões dos recipientes, os provêtes de cada camada ficaram em geral apertados ou amontoados uns nos outros, as larvas esfomeadas podiam furar para os provêtes contíguos e aí continuar seu desenvolvimento, embora o mais frequente fosse elas saírem dos provêtes exauridos e acabarem por morrer à fome, umas caídas em baixo, outras ao lado de provêtes intactos ou pouco carcomidos, que elas, todavia, não conseguiam penetrar... (1).

Outra alteração importante foi a remoção, de dentro dos recipientes n.os 1 e 4, em Junho de 1955, das camadas de provêtes mais infectadas de fungos, as quais ficaram expostas ao ar não condicionado da sala de trabalho, portanto à temperatura média de 20° C e à humidade relativa média de ~70 %.

Por causa das referidas circunstâncias e alterações, os únicos pontos sobre os quais a experiência manteve valor conclusivo foram a influência da peptona e da refrigeração na geleira.

---

(1) A dificuldade das larvas crescidas, de penetrarem em madeiras intactas, é um facto constantemente comprovado, tanto em experiências laboratoriais como em observações no exterior. Parece que a capacidade de abrir furos de entrada existe apenas nas larvas recém-nascidas. Uma vez introduzidas, a tendência das larvas é de permanecerem dentro da peça ou troço de madeira em que entraram, até transformação em insectos adultos. A esta tendência liga-se o hábito constante de «respeitarem» a película exterior da peça ou troço, que sòmente os adultos vêem a perfurar, para saírem para o exterior. A meu ver, trata-se de um instinto de defesa, centralizado na fotofobia e claustrofilia. É possível também que as modificações químicas da película exterior a tornem desagradável para as larvas.

Quanto aos provêtes desde o início expostos ao ar não condicionado da sala de trabalho, eles foram sempre conservados nessas condições, podendo portanto confrontar-se os seus resultados com os verificados naqueles recipientes.

Resultados dos provêtes mantidos em ambiente condicionado

No Quadro XII, se excluirmos o caso especial do recipiente n.º 7 e somarmos os números correspondentes aos provêtes *com* peptona, temos que de 400 larvas recém-nascidas emergiram em 2 anos 4 adultos (1 %), ao passo que, nos provêtes *sem* peptona, de 118 larvas recém-nascidas emergiram no mesmo período de tempo 2 adultos (quase 2 %).

Note-se que no recipiente n.º 7, onde as larvas introduzidas nos provêtes provinham de ovos refrigerados na geleira, os primeiros adultos surgiram sòmente em 1957, 1 ano depois do que se verificou nos outros recipientes, tendo portanto havido atraso também na emergência dos adultos.

Resultados dos provêtes mantidos em ambiente não condicionado

Das 29 larvas sobreviventes nestes provêtes (25 em provêtes de pinho *sem* peptona e com furos tapados, 4 em provêtes de pinho e casquinha *com* peptona e com furos abertos — vêde Quadro XI), ainda até à data não emergiu qualquer insecto adulto. No entanto, os provêtes mostram sinais evidentes de actividade das larvas (galerias e serrim visíveis sob a película exterior, intacta) e esses sinais são muito mais fortes nos provêtes encobertos e na parte encoberta dos provêtes do que nos provêtes e suas partes expostas, à luz e ao ar: — resultado este que vem confirmar, não só a comprovada fotofobia das larvas recém-nascidas, como a preferência, sempre verificada, das larvas crescidas, pelos sítios escuros e tranquilos.

Ilações

1.ª) A refrigeração dos ovos na geleira, nas condições anteriormente expostas, não só retarda o desenvolvimento do embrião e provoca grande mortalidade em ovos e larvas recém-nascidas,

QUADRO XII

Emergências em ambiente condicionado

Recipiente	Data em que as larvas recém-nascidas foram introduzidas nos provêtes	Provêtes	Madeira	Larvas recém-nascidas introduzidas nos provêtes	Peptona granulada Ko. 1, Fr. Witte, Rostock, comprada 4 anos antes, em soluto aquoso a 1,5 %	Adultos que emergiram
1 A Provêtes sempre *dentro* do recipiente	28 (30)-VII-1954	27	pinho bravo	108	com peptona	1 ♂ visto em 4-VIII-1956 (vivo) 1 » » » 10-VII-1957 » 1 » » » 28-VII-1957 »
1 B Provêtes *fora* do recipiente desde Junho de 1955 até agora (1 ano dentro, 2 anos fora) (*)	28 (30)-VII-1954	6	pinho bravo	24	com peptona	
4 A Provêtes *fora* do recipiente desde Junho de 1955 a Abril de 1957 (*)	6-VIII-1954	18	pinho bravo e casquinha	82	com peptona	? 1 no verão de 1956: 1 furo de saída de insecto adulto 1 ♂ visto em 10-VII-1957 (vivo)
4 B Provêtes sempre *dentro* do recipiente	6-VIII-1954	24	pinho bravo e casquinha	118	sem peptona	2 ♂♂ vistos em 4 e 13-VII-1956, o 1.º já morto 1 ♂ visto em 28-VII-1957 (já morto)
5 A Provêtes sempre *dentro* do recipiente (**)	10-VIII-1954	12	pinho bravo e casquinha	58	com peptona	1 ♂ visto em 24-VII-1956 (vivo)
6 A Provêtes sempre *dentro* do recipiente (***)	11-VIII-1954	26	pinho bravo e casquinha	128	com peptona	1 ♂ visto em 24-VII-1956 (vivo) 1 ♀ vista em 10-VII-1957 (já morta)
7 Provêtes sempre *dentro* do recipiente *Larvas provenientes de ovos refrigerados na geleira*	31-VIII-1954	44	pinho bravo e casquinha	127	com peptona	2 ♂♂ vistos em 10-VII-1957 (1 vivo, 1 já morto; ambos, tamanho pequeno)

(*) Por estarem excessivamente infectados de fungos xilófagos.

(**) Restantes provêtes deste recipiente abandonados em consequência da mortalidade total, neles verificada, das larvas recém-nascidas.

(***) Provêtes sem peptona (deste recipiente) abandonados em consequência de todas as larvas recém-nascidas terem neles morrido, no início, por causa dos furos na face superior, abertos.

como também retarda o desenvolvimento das larvas e o consequente aparecimento dos insectos adultos. Talvez que estes resultados sejam devidos ao facto de o frio atingido (frio húmido, para mais), entre — 6° e — 12° C, ser muito maior do que o que existe, mesmo no ar exterior, nas regiões do nosso país onde vive o *Hylotrupes*. Nas casas onde os progenitores tinham sido criados (naturalmente) e nas outras situações normais para o insecto, a temperatura não desce nunca além de alguns graus positivos. Se se quizer entre nós adoptar o frio como processo de retardamento dos ovos, além de fugir às grandes humidades, para evitar a infecção dos fungos oófagos, deve-se escolher uma temperatura mais branda, próxima da que o insecto naturalmente sofre, nos invernos normais, dentro das casas não aquecidas do nosso país.

2.ª) Mesmo com 9 meses a 28°-24° C (2 dias por semana a 20° C durante os últimos 4 desses 9 meses) e o resto do tempo à temperatura média de ~20° C (com *chauffage* no inverno), sempre à humidade relativa de mais de 90 % e, na maior parte, com a adição de peptona aos provêtes, sòmente ao fim de 2 anos surgiram os primeiros adultos: o que indica que, à temperatura e humidade normais das construções em Lisboa, o ciclo de vida do insecto deve ser bastante mais longo. Isto é abonado pelos resultados dos provêtes mantidos em ambiente não condicionado, em que nem depois de 3 anos surgiu ainda qualquer adulto. A fim de esclarecer este ponto — qual a duração normal do ciclo de vida do insecto pelo menos nas construções de Lisboa — numerosos outros provêtes-testemunhas têm sido infestados desde 1955 com muitas centenas de larvas.

3.ª) A maior percentagem de emergências precoces (com 2 anos de idade) nos provêtes sem peptona do que nos com peptona (daquela peptona Ko. 1, granulada, que se usou) parece indicar que essa substância não foi o factor decisivo no abreviamento do desenvolvimento do insecto; talvez que esse factor fosse antes a humidade elevada, conjuntamente com a temperatura alta, devido possìvelmente à proliferação de fungos e bactérias celulosívoros (suplemento dietético de vitaminas B e elementos acessórios) e à maior facilidade de trocas químicas e menor perda de calor e de água. Isto está de acordo com a observação frequente nas construções, de o ataque do insecto demorar menos, e os furos de saída parece que aparecerem mais cedo, nas caves, húmidas, do que nas estruturas superiores, secas.

EXPERIÊNCIA II

(1955-57)

Influência do resfriamento moderado das larvas crescidas, em pleno verão. Confronto dos adultos criados com peptona e em ambiente condicionado com os criados naturalmente. Pinho bravo.

Material e métodos

Provêtes de alburno de pinho bravo, com 10 × 3,5 × 3,5 cm, tirados de madeira sem nós, de crescimento muito rápido (camadas de primavera largas, de outono estreitas) e abatida há menos de um ano, os provêtes cortados de modo a ficarem com as camadas de crescimento paralelas a duas das faces maiores, horizontais (fig. 3).

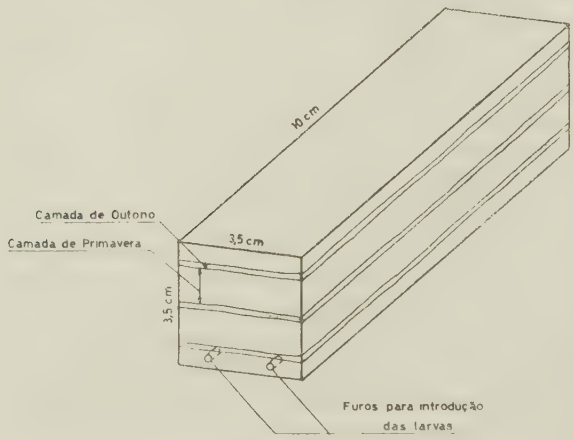


Fig. 3

Provêtes com as camadas de primavera medindo entre 5 e 8 mm de largura e as de outono entre 1 e 2 mm.

Dois furos (duas larvas) em cada provête, os furos sendo de 2 × 5 mm, feitos num tôpo, junto à face inferior, numa camada de primavera, e tapados com algodão após a introdução das larvas. Ao todo, 214 provêtes com 428 larvas.

Todos os provêtes impregnados prèviamente (antes de neles se introduzirem as larvas) com o soluto a 1 % de peptona tríptica de caseína, da firma Friedrich Witte, a impregnação fazendo-se em meio-vácuo (35-40 cm de mercúrio), durante 1/2 hora, seguido de imersão durante 2 horas.

Provêtes infestados com larvas recém-nascidas, provenientes de ovos incubados em estufa (a 28° C e 92-95 % de humidade relativa), postos por adultos colhidos nas casas do vizinho Bairro de Alvalade, muito atacado por este insecto. Ovos postos e incubados em fins de Julho e princípios de Agosto de 1955; larvas nascidas em princípios de Agosto desse ano e introduzidas nos provêtes imediatamente ou passados um a dois dias.

Provêtes, depois de infestados com as larvas, sujeitos às seguintes condições de clima:

1.°) Durante 1 ano (Agosto de 1955 a Agosto de 1956), nas condições óptimas para o crescimento larvar; isto é, primeiro a 30°, depois a 29°, por fim a 28° C, e à humidade relativa de 92 a 95 % (sobre soluto saturado de $K_2 SO_4$), nos últimos 6 meses baixando periòdicamente (2 dias por semana) a temperatura para 20° C e a humidade para 70 %.

2.°) Durante 1 mês (meados de Agosto aos meados de Setembro de 1956), arrefecimento numa câmara frigorífica, (1) oscilando diàriamente entre + 1 e + 5° C, com temperaturas de transição (8 a 10° C) na semana anterior e nas 3 seguintes a esse mês; humidade relativa ambiente, cerca de 66 % (2).

3.°) Nos 3 meses imediatos (Outubro a Dezembro de 1956), temperaturas crescentes, abaixo do óptimo (14°, 20°, 26° C), com a humidade relativa também abaixo do óptimo (80 a 90 %).

4.°) Dos fins de Dezembro de 1956 em diante, temperatura aproximando-se do óptimo (26°-28° C), mas humidade relativa bruscamente abaixada para um valor ainda um pouco menor do que o do ambiente normal do Laboratório; isto é, 60 a 65 %.

Resultados

Emergência dos adultos

Vê-se no Quadro XIII que a emergência dos adultos começou 15 meses depois do nascimento das larvas, atingiu o máximo passados 2 meses e terminou pràticamente no mês seguinte; ao todo,

(1) Câmara ozonizada durante 2 horas por dia. Teve isso alguma influência nos resultados observados?

(2) O arrefecimento realizou-se nos armazéns frigoríficos da Comissão Reguladora do Comércio do Bacalhau, por amável deferência do Presidente e Secretário da Comissão, a quem aproveito a oportunidade para agradecer aqui a possibilidade que me deram de efectuar esta experiência.

cerca de 3 meses de saída dos adultos, com um máximo a meio, muito acentuado, tal como acontece na Natureza. Também, tal como sucede na Natureza, o número dos machos excedeu o das fêmeas (50 para 30) e aqueles principiaram a emergir mais cedo, estas emergindo menos irregularmente e terminando mais tarde (fig. 4).

QUADRO XIII

Data			N.º de adultos vistos fora dos provêtes			Observações
			Total	♂♂	♀♀	
12	Novembro	1956	2	1	1	Ambos: forma típica, tam. normal
29	»	»	1	1	—	» » » »
6	Dezembro	»	2	2	—	» » » » »
16	»	»	2	2	—	» » » » »
26	»	»	2	1	1	♂ ab. *lividus*, tam. anão. ♂: forma típica, tam. normal
2	Janeiro	1957	4	3	1	Todos: » » » »
5	»	»	21	14	7	» » » » »
10	»	»	5	1	4	» » » » »
16	»	»	12	6	6	» » » » »
24	»	»	7	4	3	» » » » »
1	Fevereiro	»	8	6	2	» » » » »
8	»	»	4	3	1	» » » » »
15	»	»	4	3	1	» » » » »
22	»	»	2	2	—	Ambos: » » » »
28	«	»	2	1	1	» » » » » »
7	Março	»	1	—	1	» » » »
14	» *	»	1	—	1	» » » »

* Pelo menos até ao fim de Agosto (1957) nunca mais surgiu nenhum adulto.

Mas, contràriamente ao que se dá na Natureza, a emergência deu-se em pleno inverno. O rítmo ecológico foi completamente invertido. Por que factor? É evidente que foi o frio: foi o arrefecimento moderado (a temperaturas normais nos nossos invernos) em Agosto-Setembro, com temperaturas de transição antes e depois, continuando por uma primavera quente de três meses (14-26°), que fez desenvolver o *processus* da metamorfose pupal nas larvas já «amadurecidas». A supressão da humidade elevada em fins de

Dezembro, coincidindo com o aumento final da temperatura para próximo do óptimo (26°-28° C), ocasionou, poucos dias depois, uma avalanche de saídas de adultos — tal qual acontece, igualmente, na Natureza, segundo as nossas muitas observações sobre o Bairro de Alvalade —: era o verão, quente e seco, que surgia em pleno fim de Dezembro, precedido da primavera, em Outubro-Dezembro, e do inverno, este no pino do verão (Agosto-Setembro). Reproduziu-se artificialmente a sucessão natural das estações, abrevian-

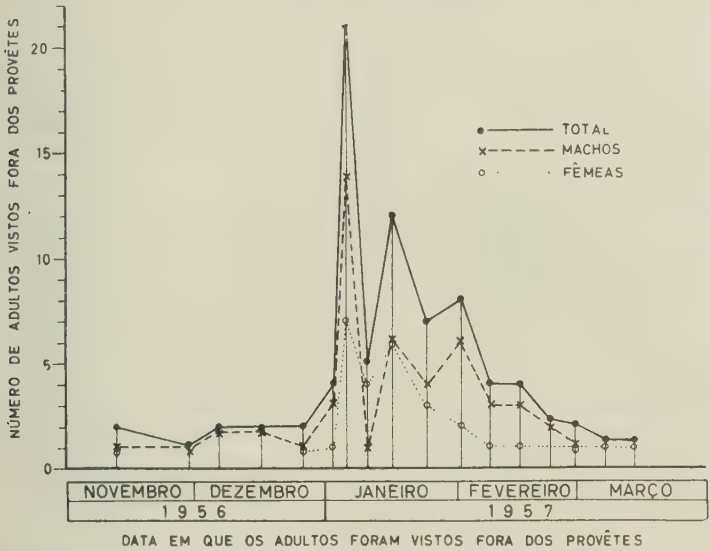


Fig. 4

do-as; e o insecto obedeceu à estimulação ecológica artificial, transformando-se e saíndo para o exterior segundo as mesmas leis que regulam a sua emergência em condições naturais. E quando veio o verão verdadeiro (Junho a fins de Agosto de 1957) nenhum insecto adulto apareceu: todas as larvas «maduras» se tinham já transformado, pela acção do frio. Aliás, sem a acção deste, a tendência das larvas criadas em ambiente de estufa é a de continuarem indefinidamente no mesmo estado.

Normalidade, longevidade e fertilidade dos adultos

Como se vê no Quadro XIII, em 80 indivíduos apenas 1 era uma aberração e tinha tamanho pequeno; todos os outros eram

perfeitamente normais, no aspecto e no tamanho. Tão grande regularidade não existe nas condições naturais, em que a proporção de aberrações e de tamanhos pequenos é muito maior.

Deu-se o inverso quanto à longevidade. Com efeito, segundo os números registados para 20 indivíduos:

5	duraram	7	dias
4	»	11	»
8	»	15	»
3	»	18	»

A longevidade mais frequente foi, pois, de umas 2 semanas, poucos atingindo 3, ao passo que nos adultos progenitores destes mesmos insectos, criados naturalmente nas casas do Bairro de Alvalade, o autor anotara anteriormente que a duração mais frequente era pelo menos de 10 a 25 dias.

A fertilidade pode avaliar-se pelo número total de ovos postos por 18 casais, seriados por ordem crescente: 15-19-24-40-80-80/118-130-140//200-216-218-220-222-263-270-270-280. Isto é, 6 casais puzeram menos do que 100 ovos, 3 entre 100 e 200 e 9 entre 200 e 300. A postura maior que se pôde controlar tinha 140 ovos. Com os progenitores destes insectos, criados em condições naturais no Bairro de Alvalade, o autor tinha registado os seguintes totais de ovos em 14 casais: 29-66-104-170-173-180-193-206-215-228-270-308-329-342. Isto é, 2 casais haviam posto menos do que 100 ovos, 5 entre 100 e 200, 4 entre 200 e 300 e 3 entre 300 e 400. A postura maior que se havia podido controlar contava 163 ovos.

A Fig. 5 exprime a diferença entre os números de ovos postos pelos dois grupos de casais. Vê-se que a fertilidade, tal como a longevidade, destes insectos foi um pouco inferior à normal, mas ainda assim bastante elevada. É possível que, pelo menos a menor longevidade, se deva atribuir, não apenas às condições especiais de aceleração em que os indivíduos foram criados, mas também à época anormal em que emergiram.

Ilações

1.º) Mediante o arrefecimento a poucos graus centígrados positivos, de larvas com 12 meses de idade, criadas em maceira com peptona e em condições óptimas de temperatura e humidade, consegue-se obter uma proporção considerável (20 %) de adultos

3 a 6 meses depois — por conseguinte, 15 a 18 meses após a postura. Contentando-nos com uma menor percentagem de adultos, deve poder fazer-se incidir o frio mais cedo e assim obter adultos mais novos. Não se determinou o limite mínimo. Por outro lado, é possível que o grau óptimo de arrefecimento das larvas — assim como o dos ovos, para retardamento da incubação — seja diferente em Portugal e na Alemanha, por exemplo, em virtude da adaptação

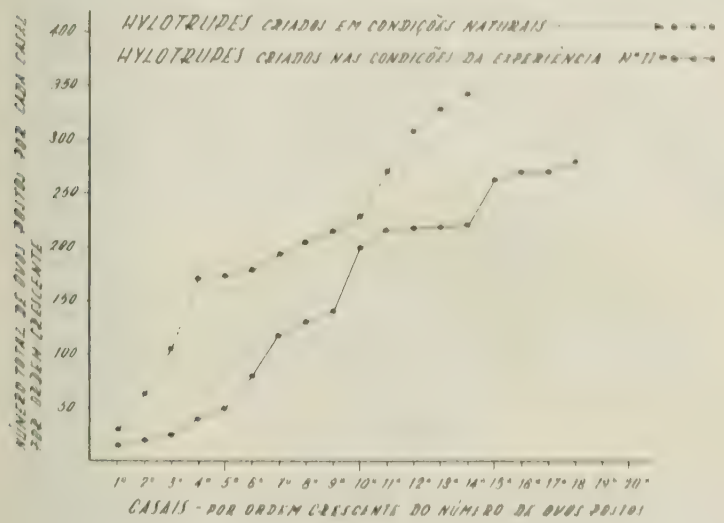


Fig. 5

da espécie ao clima ambiente. De qualquer modo, a brusca redução da humidade, no período do reaquecimento sequente ao arrefecimento, parece actuar como estimulante da emergência dos adultos, talqualmente se verifica na Natureza.

2.ª) O período do arrefecimento coincidindo com o fim do verão, a emergência dos adultos vem a dar-se em pleno inverno, o que representa a completa inversão do ritmo ecológico da espécie, em relação ao clima exterior. Isto é importante do ponto de vista prático, porque permite realizar ensaios com as larvas recém-nascidas pelo menos duas vezes por ano: no inverno, por meio do acasalamento dos adultos criados nas referidas condições; e no verão, aproveitando-se os adultos criados nas condições naturais. Deve ser mesmo possível regular o aparecimento dos adultos de

modo a realizar esses ensaios em qualquer época do ano, bastando para isso um aviso prévio de 3 meses, no mínimo, que é o tempo que medeia entre o arrefecimento e o começo da emergência dos adultos. Talvez se possa reduzir ainda esse intervalo, mediante um reaquecimento e uma redução da humidade mais bruscos.

3.ª) Os adultos criados nas condições acima indicadas diferem dos criados em condições naturais por um desenvolvimento individual muito mais normal e regular mas, em compensação, por menores longevidade e fertilidade. Aparentemente o indivíduo prospera mas a sua vitalidade diminui. No entanto, a longevidade e a fertilidade manifestadas são amplamente suficientes para a realização dos ensaios correntes de toxicidade com as larvas recém-nascidas, impondo-se, porém, averiguar se elas mantêm a resistência normal aos tóxicos. Este ponto, importante, merece indagação experimental.

EXPERIÊNCIA III
(1955-57)

Acção da penicilina, terramicina e aureomicina no crescimento larvar e na emergência, normalidade e fertilidade dos adultos. Pinho bravo.

Material e métodos

Provêtes de alburno de pinho bravo, com $10 \times 3{,}5 \times 2$ cm, tirados de madeira sem nós e abatida há menos de 1 ano, cortados de modo a ficarem o mais possível com as camadas de crescimento paralelas às duas faces maiores, horizontais (Fig. 6).

Provêtes divididos em 3 qualidades, consoante a largura das camadas de crescimento:

1.ª escolha — camadas de primavera, 5 a 9 mm; camadas de outono, 1 a 2 mm;

2.ª escolha — camadas de primavera, 2 a 5 mm; camadas de outono, 1 a 2 mm;

3.ª escolha — camadas de primavera, 1 a 3 mm; camadas de outono, 1 a 2 mm.

Um furo (1 larva) em cada provête, em tudo igual ao indicado para a experiência II.

Uns provêtes impregnados com o soluto a 1 % de peptona triptíca de caseína, tal como indicado na experiência II; outros

com peptona mais penicilina medicinal (sal potássico cristalizado, «G. Wander»), na dose de 1.000.000 U. por litro de soluto impregnante, que era o próprio soluto de peptona; outros com peptona mais terramicina medicinal (cloridrato cristalino com glicinato de sódio, marca «Pfizer»), na dose de 500 mg de terramicina para 1 litro de soluto impregnante; outros ainda com peptona mais aureomicina medicinal (cloridrato, em dispersoide «Lederle»), na dose aproximada de 100 mg de aureomicina (6 g de dispersoide) por litro de soluto impregnante.

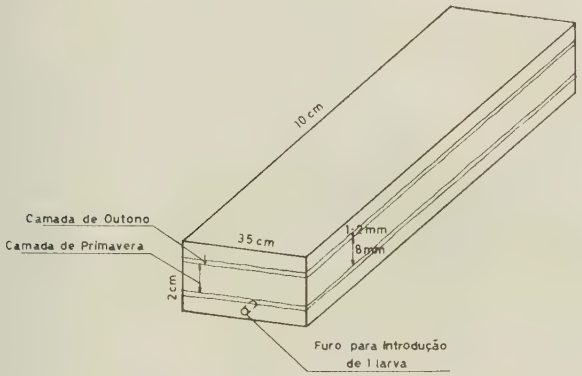


Fig. 6 — Provête de 1.ª escôlha.

Cada um destes 4 grupos incluíndo provêtes de 1.ª 2.ª e 3.ª escolhas, o mais possível iguais, dentro de cada escolha, de grupo para grupo, de modo a que os resultados fossem rigorosamente confrontáveis.

O Quadro XIV mostra o plano da experiência (1).

Provêtes infestados cada um com 1 larva recém-nascida, da mesma proveniência e na mesma data (fins de Julho e princípios de Agosto de 1955) que para a experiência II.

Depois de infestados com as larvas, provêtes sujeitos às mesmas condições climáticas que para a referida experiência, com duas pequenas diferenças respeitantes à humidade: (1.ª) nos 3 meses seguintes ao arrefecimento, a humidade manteve-se no

(1) Primitivamente empreguei cerca de 30 provêtes de cada escolha para cada grupo experimental e só mais tarde é que os subdividi em 15 não aspergidos e 15 aspergidos, quando tive a ideia de indagar a possível influência deste factor.

óptimo (92 a 95 %); e (2.ª) o abaixamento para a humidade de 60 a 65 % só se deu cerca de 15 dias mais tarde, isto é, próximo dos meados de Janeiro de 1957.

Além disso, metade dos provêtes de cada grupo e escolha foram sujeitos a 6 aspersões muito abundantes de água destilada, uma por semana, entre 1 de Fevereiro e os meados de Março de 1956, quer dizer 7 a 8 meses após a introdução das larvas recém-nascidas.

QUADRO XIV

Provêtes		N.º de provêtes				
		Com peptona	Com peptona + penicilina	Com peptona + terramicina	Com peptona + aureomicina	
Não aspergidos	1.ª escolha	15	15	15	15	60
	2.ª »	15	15	15	16	61
	3.ª »	12	12	12	12	48
		42	42	42	43	
Aspergidos	1.ª escolha	15	16	15	15	61
	2.ª »	15	14	15	15	59
	3.ª »	13	13	12	13	51
		43	43	42	43	
Totais		85	85	84	86	340

Resultados

Crescimento e sobrevivência larvar

De 26 de Julho a 5 de Agosto de 1956, portanto 12 meses após o nascimento e o início da criação das larvas e 1 mês antes de se principiar o arrefecimento no frigorífico, os provêtes foram cuidadosamente abertos um a um, as larvas pesadas até ao centigrama e novamente metidas nos provêtes, a seguir re-apertados, de modo a elas poderem continuar o seu desenvolvimento com o mínimo de pertubação. Ao mesmo tempo, tomou-se nota das larvas mortas inicialmente, nos furos onde tinham sido introduzidas, para avaliação da sobrevivência inicial, assim como se registaram as que foram feridas ou mortas acidentalmente, ao abrir os provêtes,

e as que já não se puderam pesar por já se haverem transformado em adultos ou pupas ou terem esgotado completamente os respectivos provêtes e morrido, à míngua e por deshidratação, no exterior, ao lado de provêtes inaproveitados (vêde nota na pág. 179). Mortas naturalmente dentro dos provêtes, depois de haverem começado a roer madeira, não se viu uma única, o que prova a excelência das condições em que tinham sido colocadas, tanto do ponto de vista climático como alimentar.

Os Quadros XV, XVI, XVII e XVIII mostram os resultados

QUADRO XV

Provêtes impregnados *só com peptona*

Provêtes	Madeira	N.º de larvas recém-nascidas introduzidas nos provêtes em Julho-Agosto de 1955	N.º de larvas sobreviventes	Sobrevivência inicial média %	N.º de larvas vivas dentro dos provêtes em Julho de 1956	Peso total destas larvas (cg)	Pêso médio (cg)
Não aspergidos com água	1.ª escolha	15	13		13	584	
	2.ª »	15	14		13**	501	41,8
	3.ª »	12	10		10	420	
		42	37	89,4*	36	1505	
Aspergidos abundantemente com água, 1 vez por semana, durante 6 semanas, ao fim de 7 meses	1.ª escolha	15	12		11**	558	
	2.ª »	15	15		15	499	38,6
	3.ª »	13	12		11**	370	
		43	39		37	1427	
Totais		85	76		73	2932	40

* Como a aspersão foi feita 7 meses após a introdução das larvas nos provêtes, não faria sentido distinguir entre a sobrevivência inicial dos dois grupos de provêtes (não aspergidos e aspergidos).

** Nos três casos, 1 larva tinha esgotado o respectivo provête e morrido no exterior, à míngua; ressequidas, o seu peso não seria já comparável.

QUADRO XVI

Provêtes impregnados com *peptona* + *penicilina*

Provêtes	Madeira	N.º de larvas recém-nascidas introduzidas nos provêtes em Julho-Agosto de 1955	N.º de larvas sobreviventes	Sobrevivência inicial média %	N.º de larvas vivas dentro dos provêtes em Julho de 1956	Peso total destas larvas (cg)	Peso médio (cg)
Não aspergidos	1.ª escolha	15	13		13	622	43
	2.ª »	15	15		15	514	
	3.ª »	12	12		12	591	
		42	40	93	40	1727	
Aspergidos	1.ª escolha	16	14		11*	462	37
	2.ª »	14	14		14	355	
	3.ª »	13	11		11	512	
		43	39		36	1329	
Totais		85	79		76	3056	40

* 2 larvas mortas à míngua fora dos provêtes, depois de os terem exaurido de alimento, e 1 já transformada em pupa e por isso também não pesada, enquanto que uma 4.ª, que foi pesada, já era uma prè-pupa.

QUADRO XVII

Provêtes impregnados com *peptona* + *terramicina*

Provêtes	Madeira	N.º de larvas recém-nascidas introduzidas nos provêtes em Julho-Agosto de 1955	N.º de larvas sobreviventes	Sobrevivência inicial média %	N.º de larvas vivas dentro dos provêtes em Julho de 1956	Peso total destas larvas (cg)	Peso médio (cg)
Não aspergidos	1.ª escolha	15	15		15	753	40
	2.ª »	15	14		14	390	
	3.ª »	12	11		11	465	
		42	40	88	40	1608	
Aspergidos	1.ª escolha	15	11		11	564	39,6
	2.ª »	15	13		12*	290	
	3.ª »	12	10		10	462	
		42	34		33	1316	
Totais		84	74		73	2924	40

* 1 larva morta à míngua no exterior do provête, depois de o ter exaurido completamente.

obtidos quanto ao crescimento e à sobrevivência das larvas, esta tomando apenas em conta a mortalidade natural nas larvas recém-nascidas, nos furos dos provêtes, visto que outra (natural) não houve.

QUADRO XVIII

Provêtes impregnados com *peptona + aureomicina*

Provêtes	Madeira	N.º de larvas recém-nascidas introduzidas nos provêtes em Julho-Agosto de 1955	N.º de larvas sobreviventes	Sobrevivência inicial média %	N.º de larvas vivas dentro dos provêtes em Julho de 1956	Peso total destas larvas (cg)	Peso médio (cg)
Não aspergidos	1.ª escolha	15	13		13	627	46,9
	2.ª »	16	14		14	600	
	3.ª »	12	11		10 *	508	
		43	38	92	37	1735	
Aspergidos	1.ª escolha	15	14		13 **	640	49
	2.ª »	15	14		11 ***	435	
	3.ª »	13	13		13	741	
		43	41		37	1816	
Totais		86	79		74	3551	48

* 1 larva já transformada em adulto.

** 1 larva morta no exterior do provête, totalmente exaurido de alimento.

*** 3 larvas, *idem*.

Ao apreciarmos os resultados, notemos, antes de mais nada, o grande número de larvas em cada grupo, quer introduzidas inicialmente (entre 84 e 86, ao todo 340), quer pesadas ao fim de 12 meses (entre 73 e 76, ao todo 296), o que dá aos valores obtidos boa força conclusiva.

A sobrevivência das larvas recém-nascidas foi sempre muito elevada, não havendo diferença significativa entre os quatro grupos. Registe-se, no entanto, mesmo que seja devida a simples coincidência, a tendência para baixar na peptona + terramicina e para aumentar na peptona + penicilina e na peptona + aureomicina, em relação à peptona só, que é aqui o grupo-padrão.

O crescimento larvar, ao fim de 12 meses, mostrou-se rigorosamente igual, em média, nos três primeiros grupos e apenas francamente maior (20 %) no grupo com aureomicina. É como se, ao fim e ao cabo, tivesse sido inteiramente indiferente a adição ou

não, à peptona, da penicilina e da terramicina, sòmente a aureomicina tendo revelado uma acção nítida, favorável.

Marcando os pesos individuais das larvas de cada um dos quatro grupos, independentemente da qualidade da madeira e da aspersão, forma-se a fig. 7, a qual nos revela que não foi ùnicamente a média que melhorou, mas igualmente a dispersão, bastante

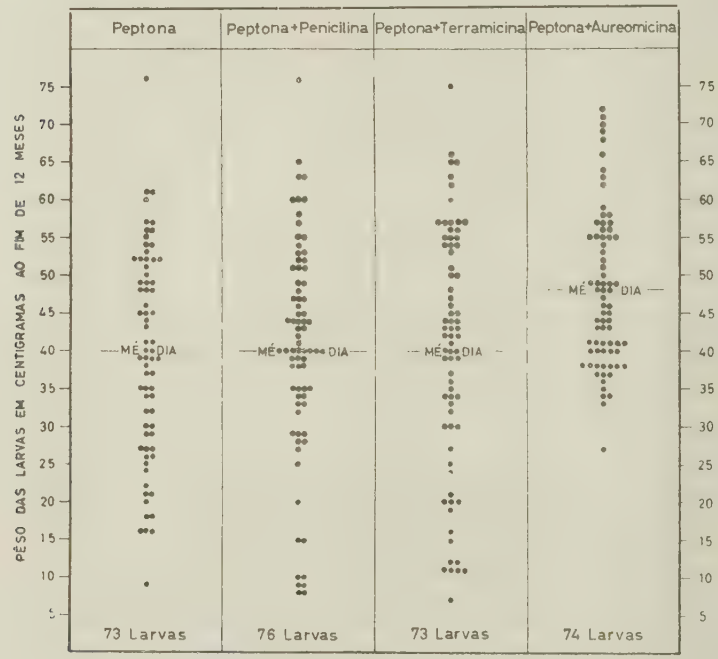


Fig. 7

menor no grupo com aureomicina do que nos outros grupos. A aureomicina evitou os valores mais baixos e aumentou os próximos do máximo, adensando os pesos à volta da média; quer dizer, a sua acção foi, a um tempo, de estimulação e de regularização do crescimento. Sob a sua influência, deixou de haver larvas raquíticas ou enfezadas, todas se aproximando de um valor médio, mais alto do que o normal.

A penicilina, embora não tendo elevado a média nem aproximado os extremos, adensou, no entanto, um pouco os valores à volta daquela, tendo, pois, um efeito ligeiramente regularizador.

A terramicina, pelo contrário, em nada parece ter melhorado a acção da peptona.

Devem-se também tomar em conta as larvas que não chegaram a ser pesadas por, na ocasião em que os provêtes foram abertos, elas já os terem há muito exaurido de alimento e morrido de fome e de deshidratação no exterior (uma tinha-se já transformado em pupa, outra em adulto), pois que tais larvas, denotando crescimento acelerado, representavam provàvelmente valores máximos, iguais ou superiores aos obtidos. Ora os seus números, respectivamente 3-3-1-5, reforçam a tendência já manifestada: destaque da aureomicina, acção nula sobretudo da terramicina.

A Fig. 8 é uma análise do gráfico anterior, obtída pela marcação dos pesos individuais das larvas, de modo a mostrar também a influência da qualidade da madeira e da aspersão, dentro de cada grupo principal.

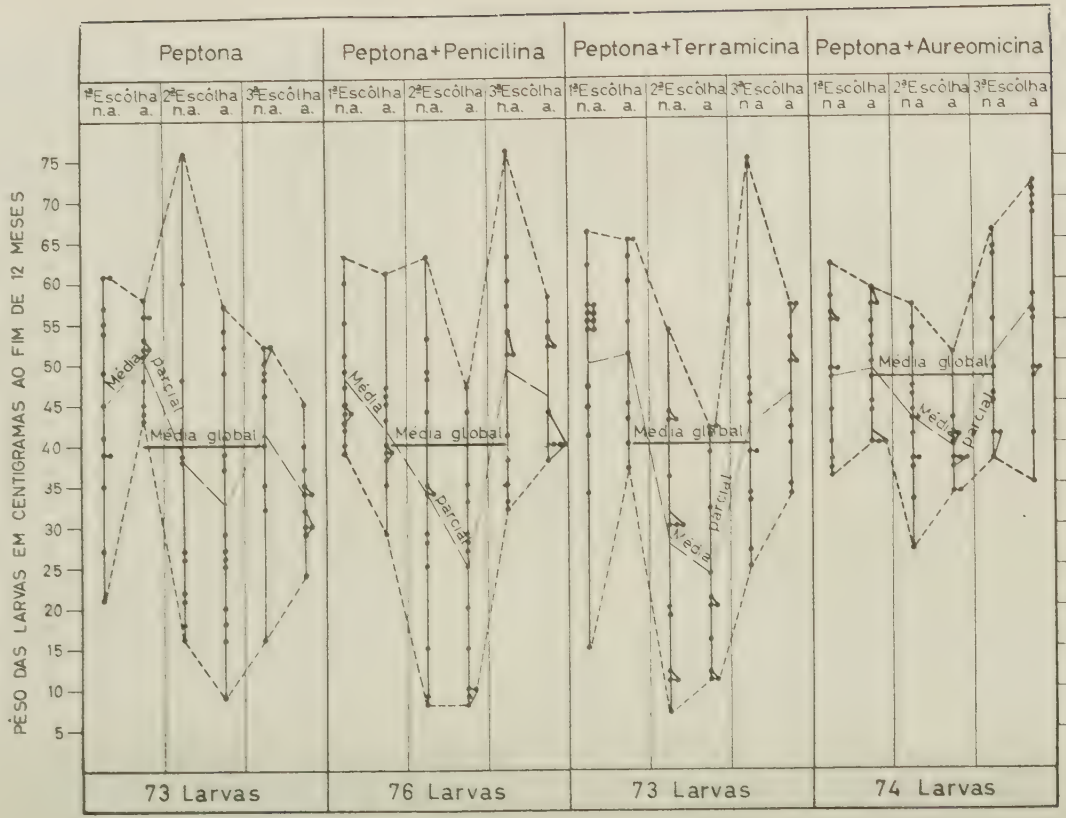
QUADRO XIX

Provêtes	N.º total de larvas ao fim de 12 meses	Peso total destas larvas (cg)	Peso médio (cg)
1.ª escolha	100	4810	48
2.ª »	108	3584	33
3.ª »	88	4069	46

Além de evidenciar, de outra maneira, os resultados gerais já expostos quanto à média global e à dispersão — esta aqui representada pela área do polígono definido pelas dispersões nos vários sub-grupos —, a Fig. 8 desvela a curiosa tendência da média parcial, em todos os grupos, de baixar dos provêtes de 1.ª escolha para os de 2.ª, para depois voltar a elevar-se nos de 3.ª.

Esta tendência aparece mais concretizada se somarmos os números e pesos das larvas de cada escolha, independentemente da aspersão e das substâncias adicionadas à madeira. Encontram-se então os valores do Quadro XIX.

As diferenças são constantes e muito grandes. Mesmo tomando em conta as larvas de crescimento muito acelerado, que não chegaram a ser pesadas por já terem morrido no exterior ou por já se haverem transformado em adultos ou em pupas, cujo número foi de 5 nos provêtes de 1.ª escolha, 5 nos de 2.ª e 2 nos de 3.ª, vê-se, pelos números do Quadro XIX, que, se elas tivessem sido



NOTA: n.a.—Não aspergidos (provêtes)
a.—Aspergidos

Fig. 8

pesadas, teriam elevado um pouco as médias da 1.ª e 2.ª escolha em relação à 3.ª, mas sem alterar fortemente essa proporção e mantendo a notória diferença da 1.ª para a 2.ª.

Por consequência, a qualidade da madeira tem uma influência grande no desenvolvimento do *Hylotrupes*. Mas, se a melhor foi geralmente a de camadas de primavera mais largas, a qualidade extrema, com as camadas de primavera mais estreitas, aproximou-se muito de perto daquela, e foi o tipo intermédio o que se revelou, de longe, o pior. Portanto, no que respeita ao crescimento das larvas do *Hylotrupes*, a qualidade da madeira não pode ser aferida com rigor pela simples largura das camadas de crescimento.

Os resultados quanto à aspersão foram menos concludentes. Os Quadros XV e XVI mostram uma média mais baixa nos provêtes aspergidos do que nos não aspergidos, mas quase igual no Quadro XVII e de sentido inverso no XVIII (com a aureomicina). A Fig. 8 revela que, dos 12 subgrupos, a média parcial, dos não aspergidos para os aspergidos, baixou em 7 casos e aumentou em 5; o mais constante foi a tendência para menor dispersão, com supressão dos valores máximos, nos provêtes aspergidos, a qual se verificou em 10 dos 12 subgrupos. A comparação das médias globais das larvas nuns e noutros provêtes indica 43 cg (153 larvas, com 6575 cg) nos não aspergidos e 41 cg (143 larvas com 5888 cg) nos aspergidos.

A diferença é pequena e, como se viu, de sentido variável. Além disso, se considerarmos o número de larvas super-desenvolvidas que não chegaram a ser pesadas (2 apenas nos provêtes não aspergidos e nada menos de 10 nos aspergidos), somos levados a admitir que, se tivesse sido possível pesá-las, os seus pesos muito altos teriam elevado muito a média dos provêtes aspergidos e, sobretudo, aumentado a dispersão nestes provêtes, com os valores que precisamente lhes faltam no caso dos três primeiros grupos (peptona, peptona + penicilina e peptona + terramicina). Assim, as diferenças acima verificadas teriam sido atenuadas.

Emergência e vitalidade dos adultos

Os resultados espressos nos Quadros XX, XXI, XXII e XXIII mostram que, de novo, tal como aconteceu com o crescimento larvar, o grupo da aureomicina foi o único que se destacou, por ter tido uma percentagem de emergências bastante maior do que

QUADRO XX

Provêtes impregnados *só com peptona*

Provêtes	Madeira	N.º de larvas vivas e intactas na ocasião em que os provêtes foram abertos, para as pesar: Julho de 1956 *	N.º de adultos que emergiram até ao fim de Fevereiro de 1957	Percentagem de emergências em relação àquele número de larvas	
				Parcial	Global
Não aspergidos	1.ª escolha	13	4	25	24
	2.ª »	13	3		
	3.ª »	10	2		
		36	9		
Aspergidos	1.ª escolha	11	3	23	
	2.ª »	14	5		
	3.ª »	10	—		
		35	8		
Totais		71	12 ♂ 5 ♀ 17	Indivíduos aberrantes ** 4 (30%)	
				» normais 13	

* Excluídas 2 larvas, involuntàriamente feridas ao abrir os provêtes.

** Aberração *lividus* MULSANT.

os outros grupos, em que apenas se nota uma leve melhoria da penicilina e da terramicina sobre a peptona só.

Observe-se que os indivíduos aberrantes, sempre menos numerosos nos grupos com antibióticos, foram completamente eliminados no grupo com a penicilina. Simples coincidência? Ou tem, o aparecimento de élitros hialinos, insuficientemente quitinizados, alguma coisa que ver com as condições nutritivas ou de crescimento?

Tal como acontece em condições naturais, em todos os grupos dominaram, nestas primeiras emergências — que é, afinal, do que se trata aqui —, os machos, numa proporção até bastante maior do que parece ser a normal.

A influência da qualidade da madeira parece também aqui existir. Somando os números de adultos emergentes nos provêtes de cada escolha, em todos os grupos, e comparando-os com os

das larvas vivas e intactas na ocasião em que os provêtes foram abertos, acham-se as seguintes percentagens:

Provêtes de 1.ª escolha	32,6
» » 2.ª »	26,6
» » 3.ª »	27,5

Diferença sensível da 1.ª para as 2.ª e 3.ª escolhas e melhoria da 3.ª sobre a 2.ª, mas muito menor do que no crescimento larvar. É como se a madeira com maior proporção de camadas de outono contrariasse ou demorasse a transformação em adultos, muito mais do que o crescimento larvar.

QUADRO XXI

Provêtes impregnados com *peptona + penicilina*

Provêtes	Madeira	N.º de larvas vivas e intactas na ocasião em que os provêtes foram abertos, para as pesar: Julho de 1956 *	N.º de adultos que emergiram até ao fim de Fevereiro de 1957	Percentagem de emergências em relação àquele número de larvas	
				Parcial	Global
Não aspergidos	1.ª escolha	13	3	21	26,6
	2.ª »	13	2		
	3.ª »	12	3		
		38	8		
Aspergidos	1.ª escolha	12	4	32	
	2.ª »	14	2		
	3.ª »	11	6		
		37	12		
Totais		75	16 ♂ + 4 ♀ = 20	Indivíduos aberrantes 0	
				» normais 20	

* Excluída 1 larva, involuntàriamente ferida ao abrir os provêtes.

Nos provêtes não aspergidos de todos os grupos a percentagem de emergências foi de 34, enquanto que nos aspergidos ela foi sòmente de 23. Contudo, tomando em conta as larvas de crescimento mais acelerado, que morreram por insuficiência de tamanho

QUADRO XXII

Provêtes impregnados com *peptona + terramicina*

Provêtes	Madeira	N.º de larvas vivas e intactas na ocasião em que os provêtes foram abertos, para as pesar (Julho de 1956)	N.º de adultos que emergiram até ao fim de Fevereiro de 1957	Percentagem de emergências em relação aquele número de larvas	
				Parcial	Global
Não aspergidos	1.ª escolha	15	8	32	26
	2.ª »	14	2		
	3.ª »	11	3		
		40	13		
Aspergidos	1.ª escolha	11	3	18	
	2.ª »	12	2		
	3.ª »	10	1		
		33	6		
Totais		73	12 ♂ + 7 ♀ = 19	Indivíduos aberrantes * 3 (19%)	
				» normais 16	

* Aberração *lividus* MULSANT.

dos provêtes — ou, porque o excessivo encharcamento dos mais aspergidos os houvesse tornado inadequados e as levasse a sair deles — e admitindo que todas elas se tivessem transformado em adultos, primeiro ou pelo menos ao mesmo tempo que as outras, nesse caso (essas larvas foram apenas 1 nos não aspergidos e 9 nos aspergidos) as percentagens passariam respectivamente para 35 e 30, diminuindo muito, embora persistindo sempre, a diferença desfavorável à aspersão.

O que acaba de expor-se vê-se em pormenor na Fig. 9, na qual se compara o peso das larvas em centigramas, na ocasião em que os provêtes foram abertos (Julho de 1956), com a percentagem de adultos que emergiram dos provêtes nos meses imediatos (até ao fim de Fevereiro de 1957). Salta à vista a semelhança das duas «curvas», indicativa de que a passagem ao estado adulto é realmente função do peso das larvas. A influência da aspersão demasiado abundante e tardia, apenas favorável na 2.ª escolha da

QUADRO XXIII

Provêtes impregnados com *peptona + aureomicina*

Provêtes	Madeira	N.º de larvas vivas e intactas na ocasião em que os provêtes foram abertos, para as pesar: Julho de 1956 *	N.º de adultos que emergiram até ao fim de Fevereiro de 1957	Percentagem de emergências em relação àquele número de larvas	
				Parcial	Global
Não aspergidos	1.ª escolha	13	7	60	40
	2.ª »	14	8		
	3.ª »	10	7		
		37	22		
Aspergidos	1.ª escolha	13	1	19,4	
	2.ª »	10	4		
	3.ª »	13	2		
		36	7		
Totais		73	21 ♂ + 8 ♀ = 29	Indivíduos aberrantes ** 6 (26%)	
				» normais 23	

* Excluída 1 larva, involuntàriamente ferida ao abrir os provêtes.

** Aberração *lividus* MULSANT.

peptona e nas 1.ª e 3.ª escolhas da peptona | penicilina, foi desfavorável em todos os outros casos, provocando muitas vezes quedas quase verticais, sobretudo na peptona + aureomicina. A superioridade discreta da madeira de 3.ª escolha sobre a de 2.ª também é manifesta, excepto no grupo da peptona.

O Quadro XXIV indica as datas em que os adultos foram vistos fora dos provêtes e quantos eram. Note-se que não são as datas da emergência, a que não assisti, mas aquelas em que, nas minhas visitas às instalações da experiência, vi os adultos saídos dos provêtes. Entre as duas datas pode haver uma diferença de alguns dias; e as anotações de dois, três, quatro e cinco adultos que vi em determinado dia e em determinado grupo experimental não querem dizer que eles houvessem saído dos provêtes todos ao mesmo tempo — o natural sendo que houvessem saído escalonadamente, durante o intervalo, um tanto variável, das minhas visitas.

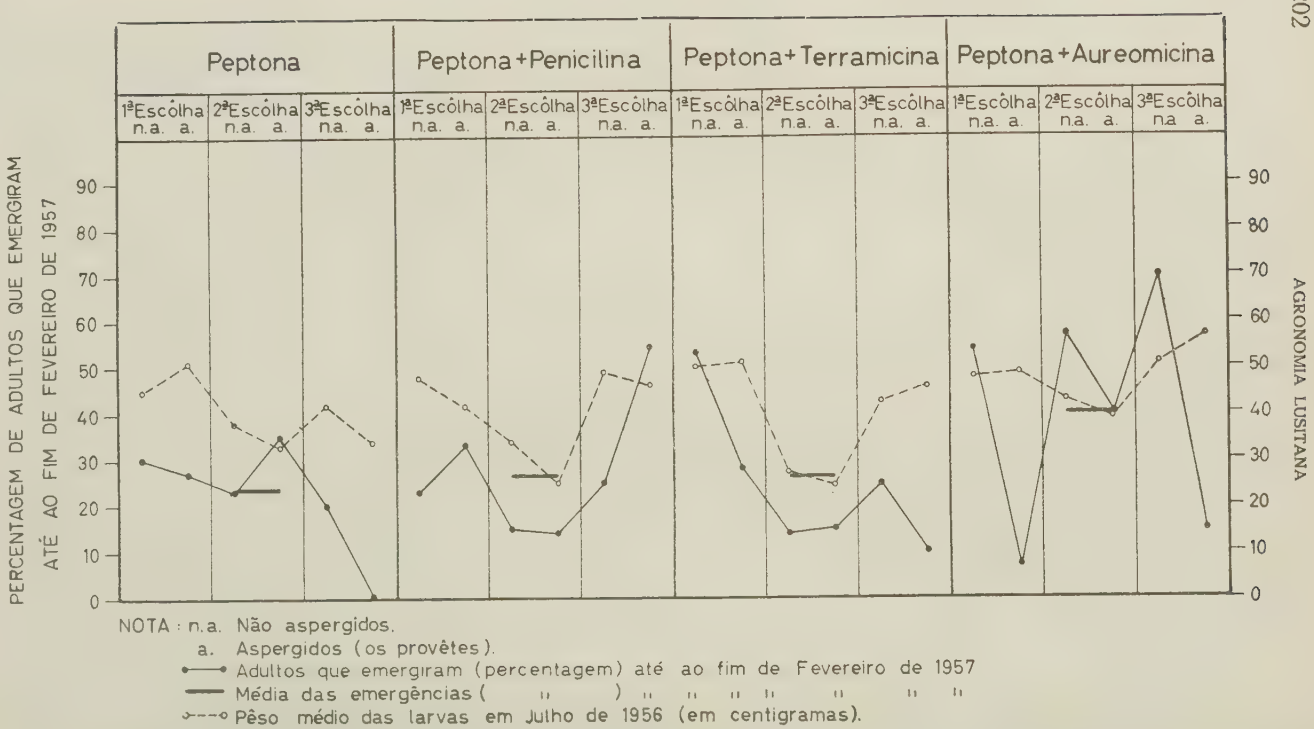

Peptona
Peptona+Penicilina
Peptona+Terramicina
Peptona+Aureomicina
1ªEscôlha n.a. a.
2ªEscôlha n.a. a.
3ªEscôlha n.a. a.
PERCENTAGEM DE ADULTOS QUE EMERGIRAM ATÉ AO FIM DE FEVEREIRO DE 1957
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90
NOTA : n.a. Não aspergidos.
a. Aspergidos (os provêtes).
Adultos que emergiram (percentagem) até ao fim de Fevereiro de 1957
Média das emergências (") " " " " " " "
Pêso médio das larvas em Julho de 1956 (em centigramas).

Fig. 9

QUADRO XXIV

Data das observações	Número de adultos vistos			
	Peptona	Pept. + penicilina	Pept. + terramicina	Pept. + aureomicina
24.VII.1956	—	—	—	1
...				
27(29).X.1956	—	2	—	—
...				
2.I .1957	1	1	—	1
7.I . »	2	1	1	1
11.I . »	1	1	2	4
16.I . »	4	3	1	5
25.I . »	2	1	3	5
2.II . »	4	2	2	5
9.II . »	1	4	3	3
16.II . »	1	3	3	2
23.II . »	1	1	2	1
1.III. »	—	1	2	1
Totais	17	20	19	29

Saíu 1 adulto, apenas com 1 ano, no grupo da aureomicina e saíram 2 com 15 meses no da penicilina, mostrando que os antibióticos favorecem o aparecimento de indivíduos precoces. Os outros adultos, em todos os grupos, começaram a sair 3 meses após o arrefecimento no frigorífico, em pleno inverno, tal como na experiência anterior, parando dois meses depois. Apercebe-se a influência estimulante do arrefecimento e não se nota diferença importante, neste aspecto, entre os vários grupos; talvez sòmente um pequeno retardamento no grupo da terramicina. A única diferença em relação à experiência anterior está em que a emergência principiou mais tarde, o que atribuí à supressão mais tardia da humidade elevada — próximo dos meados de Janeiro, como atrás disse. Observe-se que os máximos de emergência, em todos os grupos, começaram em 16 de Janeiro.

Não fiz observações pormenorizadas sobre a duração da vida dos adultos dos vários grupos; apenas posso dizer que, de modo

geral, ela me pareceu semelhante à dos adultos da experiência precedente — isto é, um pouco menor do que a normal.

O mesmo se aplica à fertilidade. Sòmente pude registar o número de ovos postos por cinco casais:

1 casal	Peptona só	320
3 casais	Peptona + terramicina	236
		186
		42
2 casais	Peptona + aureomicina ...	250
		150

o que não permite tirar conclusões comparativas dos vários grupos experimentais, mas indica que a fertilidade não foi sèriamente afectada quer pela peptona quer pelos antibióticos.

Ilações

1.ª) Impregnada na madeira juntamente com a peptona, a aureomicina revelou uma nítida acção favorável na aceleração do desenvolvimento do *Hylotrupes*. Nas larvas há um duplo efeito, de aumento e regularização do crescimento, o peso médio — quando comparado com o de larvas alimentadas sòmente com madeira + + peptona — subindo 20 % ao fim de 12 meses e desaparecendo por completo os indivíduos enfezados. Os adultos emergem mais cedo, o número de indivíduos com 18-19 meses passando de 24 % (no grupo da peptona só) para 40 % e surgindo mesmo 1 com 12 meses apenas.

Pelo contrário, a penicilina e a terramicina não mostraram acção importante na aceleração do desenvolvimento. Credite-se, no entanto, à penicilina uma ligeira regularização no aumento de peso das larvas e algum abreviamento no aparecimento dos adultos, surgindo 2 destes com 15 meses apenas e subindo as emergências de 18-19 meses em perto de 3 %.

2.ª) Os adultos criados com peptona + antibióticos mostraram uma considerável fertilidade, e a percentagem de indivíduos aberrantes (aberração *lividus* Mulsant, caracterizada por élitros hialinos ou cor de palha) foi sempre menor entre eles do que entre os criados só com peptona, tendo mesmo sido nula nos criados com peptona + penicilina. Este facto sugere a possibilidade de a falta de quitinização dos élitros estar relacionada com as condições

de alimentação ou com as de crescimento delas derivadas. Não apareceu um único indivíduo anão em qualquer dos grupos experimentais. A ilação a tirar é que, de modo geral, os antibióticos normalizam o crescimento individual sem lhes afectar, aparentemente, a fertilidade.

3.ª) Independentemente de outros factores — dispersão individual, etc. — há uma relação directa entre o peso das larvas e a passagem ao esta o adulto.

4.ª) A qualidade da madeira de pinho tem uma influência incontestável na rapidez do desenvolvimento do *Hylotrupes*, mas ela não pode avaliar-se ùnicamente pela largura das camadas de crescimento, pois o tipo extremo dos aqui experimentados, com as camadas de primavera mais finas, mostrou ser superior ao tipo intermédio, sobretudo para o crescimento larvar — o que aliás se deve esperar que aconteça no mesmo tronco, em virtude da maior riqueza em proteínas do lenho periférico, onde essas camadas são mais estreitas. No entanto, a madeira com as camadas de primavera mais largas (próximo de 1 cm) foi geralmente superior às outras.

Daqui se infere que, quanto mais rápido é o crescimento do pinho bravo, mais sujeita a madeira se torna aos grandes estragos do *Hylotrupes* e pior, portanto, ela é para os nossos usos, mas que, dentro do mesmo toro, parece que deveríamos pôr de lado precisamente a parte, à primeira vista melhor, de aneis mais estreitos (parte periférica).

5.ª) A aspersão abundante e repetida dos provêtes aos 7-8 meses de idade larvar — já por sua vez mantidos num ambiente de quase saturação — mostrou ser de modo geral inconveniente para o desenvolvimento do *Hylotrupes*, promovendo mais frequente abandono dos provêtes por parte das larvas, que vieram a morrer de inanição e deshidratação. O encharcamento superficial e mesmo interno — através das galerias periféricas — dos provêtes deve ter tido o duplo efeito nocivo de dificultar o arejamento e aumentar a fermentação da madeira, ambos graves na temperatura elevada (29°-28° C) em que os provêtes se mantinham. Confirma-se, assim, a nocividade para o *Hylotrupes* das humidades mais altas — acima do ponto de saturação das fibras.

EXPERIÊNCIA IV
(1955-57)

Criação em cêpos, sem e com peptona e antibióticos. Pinho bravo.

Material e métodos

Três cêpos de pinho bravo com 21 cm de altura por 20 cm de diâmetro, dos quais 11 cm de cerne (Fig. 10). Em baixo, uma fenda com 5 mm de fundo e 1,5 mm de largura, para introdução das larvas.

Os três cêpos tanto quanto possível iguais: extraídos do mesmo toro, contiguamente. Madeira de crescimento rápido, com as camadas de primavera largas (ao centro 7-8 mm, na periferia 4-5 mm) e as de outono estreitas (1-1,5 mm).

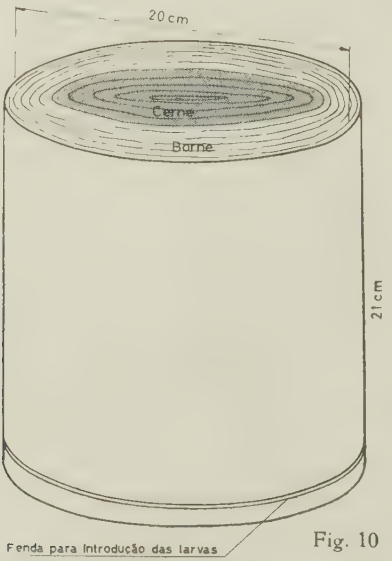


Fig. 10

Um cêpo-testemunha, sem qualquer substância adicionada; outro impregnado com o soluto aquoso de peptona tríptica de caseína, a 1%; o outro impregnado com o mesmo soluto, mais penicilina medicinal (sal potássico cristalizado, «G. Wander»), na dose de 1 000 000 U. por litro, mais aureomicina medicinal (cloridrato, em dispersoide «Lederle»), na dose aproximada de 50 mg de aureomicina (3 g de dispersoide) por litro, ou seja metade da dose empregada no 4.º grupo da experiência III.

Cada um dos cêpos infestado sucessivamente com 100 + 100 +

+ 100 larvas recém-nascidas, com alguns dias de intervalo, tendo verificado, nas 2.ª e 3.ª vezes, o desaparecimento da maior parte das larvas introduzidas na vez anterior, certamente devoradas pelas suas semelhantes. Fenda tapada, após cada introdução das larvas, com algodão em rama.Larvas dos mesmos progenitores, eclodidas nas mesmas condições e introduzidas na mesma data (princípios de Agosto de 1955) que as utilizadas nas experiências II e III.

Cêpos, depois de infestados com as larvas, sujeitos também às mesmas condições de temperatura e humidade que os provêtes daquelas duas experiências — os 3 cêpos tendo sido encharcados com água distilada, uma vez por semana, entre 1 de Fevereiro e os meados de Março de 1956, tal como fiz a metade dos provêtes da experiência III.

Resultados

Emergência e fertilidade dos adultos

Não faria sentido estabelecer a proporção dos adultos emergentes para as larvas introduzidas, por causa da enorme mortalidade, atribuída ao canibalismo, nestas verificado, que não permitiu precisar o número de larvas sobreviventes: apenas sabemos que foi muitíssimo menor do que o das larvas introduzidas.

O Quadro XXV mostra, a favor do cêpo com antibióticos, as seguintes vantagens: 1.ª) aumento de 23,5 % nas emergências ao ao fim de 18-19 meses; 2.ª) muito melhor distribuição dos sexos, o número de fêmeas quase igualando o dos machos, contra uma enorme desigualdade no outro cêpo; 3.ª) conformação e tamanho dos indivíduos muito mais normais, os aberrantes e os tamanhos pequenos não passando de 23,8 %, contra 64,7 %.

Apenas pude observar os números de ovos postos por 3 casais de cada um dos grupos (Quadro XXVI).

Houve uma leve diminuição no número de ovos postos pelos casais criados no cêpo com antibióticos, mas o número de casais é demasiado pequeno para dar a este resultado valor conclusivo.

Ilações

1.ª) A ideia de criar o *Hylotrupes* em cêpos, para o aproximar das condições em que vive na floresta, redundou num insucesso: 1.º) porque se introduziram as larvas todas juntas numa fenda única, o que levou a um fortíssimo canibalismo, êrro que se poderia perfeitamente evitar; mas, também (2.º) porque apareceram indi-

QUADRO XXV

Data	Adultos vistos fora dos cêpos		
	Cêpo testemunha	Cêpo impregnado com peptona	Cêpo impregnado com peptona + penicilina + aureomicina
2.I.1957	—	—	1
7 »	—	1	2
11 »	—	2	3
16 »	—	4	2
24 »	—	2	2
1.II.1957	—	5	8
...			
14.II.1957	—	2	2
...			
28.II.1957	—	1	1
Totais	0	17	21
♂		14	11
♀		3	10
Forma típica, tamanho normal		6	15
» » » pequeno		—	1
Aberração *puellus* VILLA (tamanho muito pequeno, cor castanha)		10	4
Aberração *lividus* MULSANT (élitros hialinos), tamanho normal		—	1
Idem, tamanho pequeno		1	—
		Tam. normal (35 %) 6	76 % 16
		Tam. miudo 11	5

QUADRO XXVI

Cêpo com peptona	Cêpo com peptona + penicilina + aureomicina
1.º casal . . . . 173 ovos	4.º casal . . . . 140 ovos
2.º casal . . . . 150 »	5.º casal . . . . 131 »
3.º casal . . . . 46 »	6.º casal . . . . 20 »

víduos aberrantes e tamanhos pequenos em percentagem muito maior do que em provêtes individuais.

2.ª) Apesar disso, essa criação permitiu verificar mais uma

vez as vantagens dos antibióticos associados à peptona: maior percentagem de emergências precoces e melhor desenvolvimento individual (menor número de aberrantes e de tamanhos pequenos). Também aqui se verificou uma melhor distribuição dos sexos, o que não se notara na criação em provêtes individuais (vêde experiência III).

EXPERIÊNCIA V
(1956)

Crescimento comparado, sob a influência de factores aceleradores (peptona, antibióticos, misto vitamínico e vitamina T), de larvas normais e larvas sobreviventes do envenenamento com preservativos. Pinho bravo.

Plano da experiência

Este plano está resumido no Quadro XXVII.

Material e métodos

Provêtes de alburno de pinho bravo, com 5 × 2,5 × 1,5 cm, cortados de modo a que as camadas de crescimento ficassem o mais possível paralelas às duas faces menores (Fig. 11). Largura média das camadas de crescimento: de primavera, 5 a 6 mm; de outono, 1 a 2 mm.

Peptona tríptica de caseína, idêntica à empregada nas experiências anteriores (II a IV), e também a 1 % (10 g por litro de água distilada).

Cloromicetina clínica (cloranfenicol) da marca Park, Davis & Co., em frascos de 12 cápsulas: 2 g de pó por litro de soluto de peptona.

Estreptomicina clínica (sulfato de estreptomicina + sulfato de dihidroestreptomicina, em partes iguais: 0,5 g cada), do Instituto Luso-Fármaco de Lisboa: 2 g por litro de soluto de peptona.

Penicilina clínica, igual à utilizada nas experiências anteriores, a 2 000 000 U. e a 4 000 000 U. por litro de soluto de peptona.

«Protovit» Roche (vitaminas A, B_1, B_2, nicotilamida, B_6, pantenol, biotina, C, D e F, num excipiente xaroposo), normal, em frascos de 25 ml de xarope: 4 ml de xarope por litro de soluto de peptona.

QUADRO XXVII

Clima	Alimentação	Larvas normais com 4 a 7 meses		Larvas irmãs dessas mas tendo vivido em madeira tratada com preservativos	
		N.º de provêtes	N.º de larvas	N.º de provêtes	N.º de larvas
Natural (do interior do L.N.E.C.)	Provêtes-testemunhas (contrôle geral)	10	20	5	9
Condicionado (28º-20º C e aspersões com água)	Provêtes-testemunhas (contr. parcial).	10	20	5	9
	Provêtes com peptona a 1 % . . .	10	20	5	9
	Provêtes com peptona a 1 % mais cloromicetina a 2‰	10	20	5	10
	Provêtes com peptona a 1 % mais estreptomicina a 2‰.	10	20	5	10
	Provêtes com peptona a 1 % mais penicilina diluida (2 000 000 U. por litro de soluto de peptona)	10	20	5	10
	Provêtes com peptona a 1 % mais penicilina concentrada (4 000 000 U. por litro de soluto de peptona) . . .	10	20	5	10
	Provêtes com peptona a 1% mais «Protovit» Roche (4 ml de xarope por litro de sol. de peptona). . .	10	20	5	9
	Provêtes com peptona a 1 % mais vitamina T Hubber (4 ml de xarope por litro de soluto de peptona) . . .	10	20	5	9

Vitamina T Hubber, em xarope normal, frascos de 50 ml: 4 ml de xarope por litro de soluto de peptona.

Em geral, duas larvas em cada provête, metidas em orifícios de tôpo, em baixo, tapados depois com algodão.

Dois grupos completamente distintos de larvas irmãs (com a mesma idade e nascidas de ovos postos pelos mesmos progenitores), mantidas exactamente nas mesmas condições climáticas (à volta de 20º C e 70-75 % de humidade relativa), mas umas (larvas normais) tendo crescido em provêtes-testemunhas, de madeira não tratada nem adicionada de qualquer substância, as outras em provêtes tratados superficialmente (por imersões de 5, 10 e 15 segundos) em vários preservativos (quase todos à base de penta-

clorofenol, os restantes de naftenato de cobre), havendo, por consequência, sobrevivido à roedura da camada superficial de veneno nesses provêtes.

Depois de viverem 4 a 7 meses em tais provêtes (superficialmente envenenados, interiormente não), geralmente mais pequenas do que as suas irmãs dos provêtes-testemunhas, ¿qual seria o comportamento dessas larvas, em relação a estas, se colocadas (ambas) em condições particularmente favoráveis de nutrição

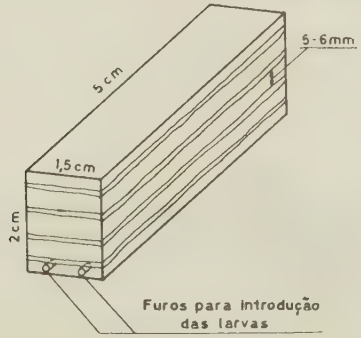


Fig. 11

e clima? Sobreviveriam em maior ou menor percentagem? Cresceriam mais depressa ou mais devagar?

Eis a ideia central desta experiência, nascida da intenção de aproveitar as larvas sobreviventes dos ensaios dos preservativos (acção preventiva ou inibidora), para o confronto dos dois grupos de larvas (as dos provêtes-testemunhas e a dos provêtes tratados) e, ao mesmo tempo, para a determinação da influência no crescimento de alguns antibióticos e vitaminas que na ocasião tinha disponíveis.

As larvas foram, evidentemente, mudadas dos provêtes em que até aí haviam vivido para os provêtes preparados para esta experiência, a mudança começando a fazer-se em fins de Novembro de 1955 (quando as larvas tinham 4 meses de idade) e terminando em fins de Fevereiro de 1956 (quando elas tinham 7 meses), mas havendo o cuidado de as distribuir por todos os grupos de novos provêtes de modo a que cada um recebesse larvas das mesmas idade e proveniência e na mesma proporção que os outros grupos.

Em 1 de Março de 1956, terminada aquela mudança, os novos

provêtes foram postos em recipientes fechados, de vidro, e submetidos a iguais condições de clima:

— Março a Setembro, inclusivé (7 meses), a 28° C cada 5 dias, seguidos de 2 dias a 20° C, com 4 aspersões semanais, abundantes, de água distilada, no primeiro mês, seguidas de raras aspersões alternando com longas exposições ao ar natural da sala;
— Outubro, à temperatura e à humidade naturais da sala;
— Novembro, a 21°-24° C de dia, um pouco menos de noite, e à humidade natural da sala;
— Dezembro, a 22°-26° C de dia, um pouco menos de noite, e à humidade natural da sala.

De 21 de Novembro a 14 de Dezembro os provêtes foram abertos e as larvas pesadas, obtendo-se os resultados a seguir expostos, correspondentes a 9-12 meses de sujeição às condições da experiência.

Resultados

Sobrevivência

Segundo os números do Quadro XXVIII, parece que, nas larvas normais, a peptona melhorou um pouco a sobrevivência em relação à madeira simples, enquanto que os antibióticos e as vitaminas não beneficiaram a acção da proteína. Note-se a baixa sobrevivência nos provêtes com estreptomicina e com «Protovit» Roche.

Quanto às larvas provindas dos provêtes tratados com preservativos, embora os números do Quadro XXIX sejam bastante diferentes, mantém-se, no entanto, a tendência geral verificada para as larvas normais: melhoria, aqui muito grande, da peptona sobre a madeira simples; valores muito baixos nos provêtes com estreptomicina e «Protovit» Roche.

... O que começa a consolidar a possibilidade de realmente haver alguma relação entre as substâncias impregnadas nos provêtes e a sobrevivência das larvas neles metidas, apesar de a maior parte das mortes se ter dado logo de início, após nenhuma ou pouca prova de roedura efectiva. ¿Poder-se-á admitir alguma acção de repulsa ou menor palatabilidade da madeira impregnada com a estreptomicina e o «Protovit» Roche?

QUADRO XXVIII

Larvas normais

Clima	Alimentação	N.º inicial de larvas	N.º final de larvas *	Sobrevivent. %	Percentagem global
Natural	Provêtes-testemunhas (contrôle geral)	20	8	40	33
Condicionado	Provêtes-testemunhas (contrôle parcial)	20	6	30	
	Provêtes com peptona	20	10	50	
	» » » + cloromicetina	20	7	33	
	» » » + estreptomicina	20	4	20	
	» » » + penicilina diluída	20	9	45	
	» » » + penicilina concentrada	20	7	33	
	» » » + « Protovit » Roche	20	5	25	
	» » » + vitamina T Hubber	20	6	30	

* A maior parte das restantes larvas tinham morrido inicialmente, isto é, no próprio orifício onde foram introduzidas, ou próximo, sem haverem roído ou havendo roído pouca madeira; três larvas dos provêtes com penicilina concentrada tinham morrido no exterior, à míngua, depois de haverem esgotado os provêtes; outras podem ter sido devoradas pelas suas companheiras de provête. Estas duas últimas ocorrências constituem, é claro, causas de êrro na interpretação dos resultados.

QUADRO XXIX

Larvas provenientes dos provêtes tratados com preservativos

Clima	Alimentação	N.º inicial de larvas	N.º final de larvas *	Sobrevivent. %	Percentagem global
Natural	Provêtes-testemunhas (contrôle geral)	9	1	11	23,5
Condicionado	Provêtes-testemunhas (contrôle parcial)	9	0	0	
	Provêtes com peptona	9	3	33	
	» » » + cloromicetina	10	4	40	
	» » » + estreptomicina	10	1	10	
	» » » + penicilina diluída	10	4	40	
	» » » + penicilina concentrada	10	3	30	
	» » » + « Protovit » Roche	9	1	11	
	» » » + vitamina T Hubber	9	3	33	

* Tal como se observou sobre o quadro anterior, a maior parte das restantes larvas tinham morrido inicialmente; outras podem também ter sido devoradas pelas suas companheiras de provête, pois em muitos casos, como para o primeiro grupo de larvas, não houve maneira de se encontrar a 2.ª larva de cada provête

Note-se, no Quadro XXIX, que a cloromicetina e a penicilina beneficiaram a acção da peptona, enquanto que a vitamina T a não prejudicou. Além disso, a sobrevivência global baixou de 1/3 nas larvas normais para 1/4 nestas larvas, denotando talvez maior susceptibilidade, isto é, menor resistência à mudança de ambiente.

Crescimento

Infere-se dos números do Quadro XXX, sobre as larvas normais, que também no crescimento — não apenas na sobrevivência — a estreptomicina prejudicou fortemente a acção da peptona (a coincidência destes resultados começa a dar-lhes valor conclusivo). Cloromicetina e «Protovit» Roche influiram pouco, enquanto que a penicilina (sobretudo a concentrada) e a vitamina T beneficiaram muito a acção da peptona, aumentando para 46 vezes (mais 16 vezes que a peptona) a aceleração do crescimento em relação às larvas do contrôle geral.

O relativamente pequeno aumento de crescimento nos provêtes-testemunhas em clima condicionado (contrôle parcial) sobre os dos provêtes-testemunhas em clima natural (apenas o quádruplo) pode atribuir-se à baixa de temperatura nos dois últimos meses

QUADRO XXX

Larvas normais

Clima	Alimentação	Nº de larvas	Peso total das larvas (mg)	Peso médio (mg)	Aumento do peso médio em relação ao do contr. geral	Diferença para o peso médio dos prov. com peptona
Natural	Provêtes-testemunhas (contrôle geral)	8	21	2,6	1	
Condicionado	Provêtes-testemunhas (contrôle parcial)	6	58	9,6	4 ×	
	Provêtes com peptona	10	790	79	30 ×	
	» » » + cloromicetina	7	650	93	35,7 ×	+ 5,7 ×
	» » » + estreptomicina	4	141	35,2	13,5 ×	−16,5 ×
	» » » + penicilina diluída	9	940	104,4	40 ×	+ 10 ×
	» » » + penicilina concentrada	7	840	120	46 ×	+ 16 ×
	» » » + «Protovit» Roche	5	450	90	34,6 ×	+ 4,6 ×
	» » » + vitamina T Hubber	6	710	118	45,5 ×	+15,5 ×

(Outubro e Novembro, 1956) e às grandes variações da humidade com predomínio de longos períodos secos.

No Quadro XXXI, referente às larvas provindas dos provêtes com preservativos, infere-se que o «Protovit» Roche, a cloromicetina e a estreptomicina prejudicaram a infuência favorável da peptona, enquanto que a penicilina e a vitamina T ou a beneficiaram um poucochinho ou não a prejudicaram grandemente.

As acelerações achadas em relação ao contrôle geral — da ordem das 150 vezes nos provêtes com peptona, peptona + penicilina e peptona + vitamina T e em média de 122 vezes nos 7 grupos com substâncias adicionais — são realmente extraordinárias. É claro que o pequeníssimo número de larvas de cada unidade experimental dá pouco valor às médias e, sobretudo, a sobrevivência de uma única larva no contrôle geral torna a comparação quantitativa com as outras unidades muito precária. Mas, mesmo elevando o peso dessa larva (do contrôle geral) para os 2,6 mg das larvas normais (o que é uma concessão, pois o peso *inicial* das larvas tratadas era realmente menor do que o das normais) ainda assim, evidentemente, a aceleração do crescimento nas larvas provenientes dos provêtes tratados continuaria a ser bastante maior, tanto em média dos 7 grupos com substâncias adicionais como no valor

QUADRO XXXI

Larvas provenientes de provêtes tratados com preservativos

Clima	Alimentação	N.º de larvas	Pêso total das larvas (mg)	Peso médio das larvas (mg)
Natural	Provêtes-testemunhas (contrôle geral)	1	1	1
Condicionado	Provêtes-testemunhas (contrôle parcial)	0	—	—
	Provêtes com peptona	3	460	153
	» » » + cloromicetina	4	239	60
	» » » + estreptomicina	1	100	100
	» » » + penicilina diluída	4	620	155
	» » » + penicilina concentrada	3	440	147
	» » » + «Protovit» Roche	1	30	30
	» » » + vitamina T Hubber	3	430	143

máximo, que seriam respectivamente 47 vezes em lugar de 37 e 62 vezes em lugar de 46.

Ilações

1.ª) Postas em confronto, larvas jóvens crescidas em madeira simples com larvas irmãs mas crescidas em madeira tratada superficialmente com preservativos, estas, se, por um lado, mostraram menor grau de sobrevivência, denotando talvez maior susceptibilidade às mudanças de ambiente, por outro lado, quando colocadas em condições estimulantes de nutrição e clima, cresceram consideràvelmente mais depressa do que aquelas, indicando maior poder de recuperação. Quer dizer que, sob certo aspecto, a ingestão de pequenas doses de preservativos actua como um tónico e pode servir como um primeiro passo para a aquisição de resistência a esses produtos (trata-se principalmente de pentaclorofenol). Os tratamentos deficientes, na dose de preservativo ou no processo ou tempo de aplicação, são portanto perigosos.

2.ª) A estreptomicina revelou-se sempre prejudicial, na sobrevivência e no crescimento larvar, sugerindo que possa tornar a madeira, não só menos palatável, como menos nutritiva (ou ela ou qualquer dos adjuvantes da forma clínica). O misto vitamínico xaroposo designado por «Protovit» (Roche) também se revelou desfavorável para a sobrevivência, sendo de admitir que torne a madeira pouco palatável para as larvas do *Hylotrupes*. A cloromicetina teve uma acção variável. A penicilina e a vitamina T é que mostraram influência mais favorável na sobrevivência e no crescimento — a penicilina concentrada (4 000 000 U. por litro de soluto impregnante) geralmente melhor do que a diluída (2 000 000 U. por litro).

É claro que o emprego das formas clínicas, com estabilizantes e conservantes, não permite conclusões muito seguras quanto aos produtos em si mesmos.

SUMMARY

ANTIBIOTICS, VITAMINS AND OTHER FACTORS IN THE DEVELOPMENT OF *HYLOTRUPES BAJULUS* (L.)

I

The long life-cycle of *Hylotrupes bajulus* under natural conditions being an obstacle for the regular carrying out of standardised tests of wood preservatives, the German research workers

devoted themselves to find out climatic and nutritive conditions favouring the acceleration of growth.

They worked out a method of accelerated breeding that consists essentially in growing the larvae in wood blocks previously impregnated with peptone and kept at a temperature of 30° to 28° C and at a relative humidity of around 95 %, after a certain time lowering periodically both the temperature and the relative humidity. In order to stimulate the transformation of larvae into pupae — which was found to be a great difficulty — they advised the refrigeration of mature larvae at temperatures well below the water-freezing point.

The distinguished biologist Dr. GÜNTHER BECKER, of the *Bundesanstalt für Materialprüfung*, Berlin-Dahlem, was the main contributor to the above results, and it is precisely on two of his works that my present experiments are based.

Experiment no. I represents my first attempt at the laboratorial breeding of *Hylotrupes* — an attempt based on very scarce bibliographical hints. It shows however the consequences (for the survival of *Hylotrupes's* egg-larvae) of too-high humidities and too-heavy impregnation with peptone, prolonged exposure of the eggs to negative temperatures, etc. Different woods were tested, but with inconclusive results.

In all the other experiments, only the wood of maritime pine (the most common in Portugal) was used.

Experiment no. II shows that by creating an artificial moderate winter in the middle of the summer, 12 months'old larvae grown in peptone-impregnated wood can emerge as adults, in great numbers, in the very heart of the immediate natural winter. Therefore the possibility of making preventive-action tests at least twice a year is proved.

No. III experiment discloses the accelerating action exerted by aureomycin, both in the growing of larvae and the emergence of adults. Penicillin and terramycin did not show any significative effect.

No. IV experiment confirms the accelerating effect of a mixture of penicillin and aureomycin, while disproving the method of breeding in log stumps.

Experiment no. V compares the effect of chlormycetin, streptomycin, dilute and concentrated penicillin, a mixture of vitamins and vitamin T upon the growth of normal larvae, on one side,

and larvae that had resisted the treatment with wood-presevatives, on the other. The higher growth-rate of the second group of larvae was the interesting result.

The use of the clinical forms of both antibiotics and vitamins is an inconvenient that the author was unable to avoid.

A second set of experiments, exploring more fully the possibilities of antibiotics and vitamins in the development of *Hylotrupes bajulus*, is in progress.

BIBLIOGRAFIA

(1) BECKER, G.
1949 Beiträge zur Ökologie der Hausbockkäferlarven. *Z. angew. Ent.* **31**: 135-174.

(2) ————
1949 Ergebnisse der Hausbockforschung. *Anz. Schädlingsk.* **22** (7).

PUBLICAÇÃO DA
DIRECÇÃO GERAL DOS SERVIÇOS AGRÍCOLAS
Repartição de Estudos, Informação e Propaganda

SUMÁRIO

Sharma, Arun Kumar & Bal, Arya Kumar — CHROMOSOME STUDIES IN *CITRUS* — I. . . . 101-126

Almeida, J. Leão Ferreira de — TREVOS AUTOTETRAPLOIDES — I. O CASO DE *TRIFOLIUM RESUPINATUM* L. SSP. *SUAVEOLENS* (WILLD.) DINSM. . . 127-144

Natividade, J. Vieira — JUVENILIDADE NA *OLEA EUROPAEA* L. 145-159

Saraiva, Alberto Coutinho — ANTIBIÓTICOS, VITAMINAS E OUTROS FACTORES NO DESENVOLVIMENTO DO *HYLOTRUPES BAJULUS* (L.) — I. 161-218

TODA A CORRESPONDÊNCIA E PERMUTA REFERENTE À AGRONOMIA LUSITANA DEVE SER DIRIGIDA A:

POUR L'ÉCHANGE OU POUR LA CORRESPONDANCE CONCERNANT L'AGRONOMIA LUSITANA ON DOIT S'ADDRESSER À:

LETTERS AND EXCHANGE CONCERNING AGRONOMIA LUSITANA TO BE ADDRESSED TO:

ESTAÇÃO AGRONÓMICA NACIONAL

SACAVÉM

PORTUGAL